

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Die Ermittlung des Ribonukleinstoffgehaltes organischen Materials
durch quantitative Uracilbestimmung im Nanogrammbereich
mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie
an stark saurem Kationenaustauscher

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Marianne Breter, geb. Schnaus
aus Wiesbaden

Mainz
1976

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Die Ermittlung des Ribonukleinsäuregehaltes organischen Materials
durch quantitative Uracilbestimmung im Nanogrammbereich
mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie
an stark saurem Kationenaustauscher

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

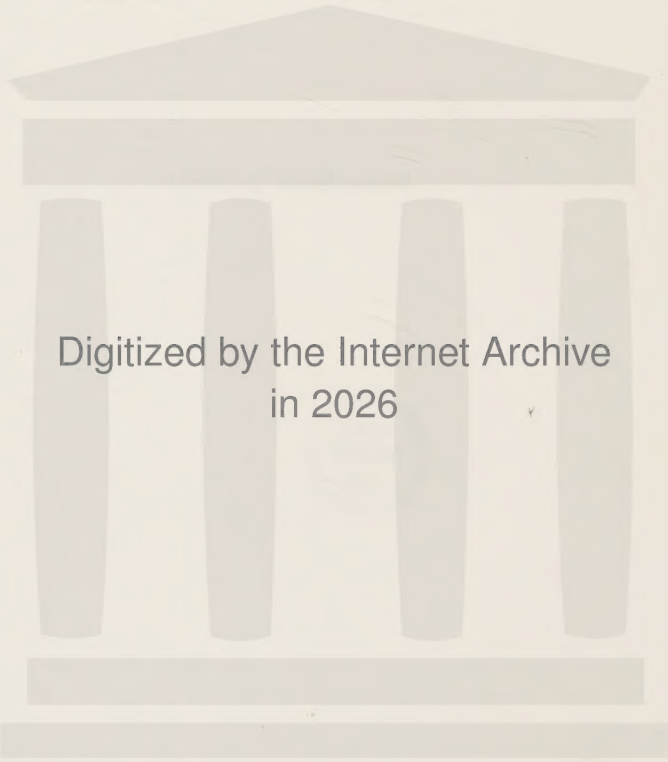
vorgelegt von
Marianne Breter, geb. Schnaus
aus Wiesbaden

Mainz
1976



Fachbereichsdekan : Professor Dr. med. Dr. rer.nat. Jürgen Grote
1. Gutachter : Professor Dr. med. Rudolf K. Zahn
2. Gutachter : Professor Dr. ing. Dieter Weinblum

Meiner Mutter gewidmet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Herrn Professor Dr. med. Rudolf K. Zahn, der Arbeitsgruppe für Programmierte Synthese am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Mainz und den Laboratories for Marine Molecular Biology in Rovinj (Jugoslawien) möchte ich für die Überlassung des Themas und die großzügige finanzielle Unterstützung sowie für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien recht herzlich danken. Sie haben damit in großem Maße zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Herrn Professor Dr. R. K. Zahn sei auch insbesondere für seine stete Hilfe und die anregenden Diskussionsbeiträge gedankt.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure	
RNA	Ribonukleinsäure	
UMP, UDP, UTP	Uridinmono-, di-, triphosphat	
(A+T)/(G+C)	Basenquotient einer DNA	
HPLC	high-pressure liquid chromatography, high-performance liquid chromatography	
PCA	Perchlorsäure	
M	Mol, molar	
mM	Millimol, millimolar	(10 ⁻³ M)
μM	Mikromol, mikromolar	(10 ⁻⁶ M)
nM	Nanomol, nanomolar	(10 ⁻⁹ M)
pM	Picomol, picomolar	(10 ⁻¹² M)
g	Gramm	
mg	Milligramm	
μg	Mikrogramm	
cpm	counts per minute	
N	Normalität, normal	
nm	Nanometer	
E ₂₅₄	Extinktion bei 254 nm	
ml	Milliliter	
μl	Mikroliter	
h	Stunde, Stunden	
min	Minute, Minuten	
MG	Molekulargewicht	

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Entwicklung der Nukleinstureanalytik	7
1.2 Quantitative Bestimmung von DNA und RNA	9
1.3 Hochdruckflüssigchromatographie	13
1.3.1 Grundlagen der konventionellen Chromatographieverfahren .	14
1.3.2 Grundlagen der schnellen Flüssigchromatographie (Hoch- druckflüssigchromatographie)	18
2. Untersuchungsmaterialien, Chemikalien und Geräte	21
2.1 Untersuchungsmaterialien	21
2.1.1 Rattengewebe	21
2.1.2 Bäckerhefe	21
2.1.3 Seeigeleier und -embryonen	21
2.2 Chemikalien	21
2.2.1 Ionenaustauscher	21
2.2.2 Radiobiochemica und Szintillatorflüssigkeit	22
2.2.3 Feinbiochemica	22
2.3 Apparaturen	22
2.3.1 Hochdruckflüssigchromatograph	22
2.3.2 UV-Detektor für die Hochdruckflüssigchromatographie	22
2.3.3 UV-Durchflußschreiber und Fraktionssammler	24
2.3.4 Kompensationsschreiber und Integrator	24
2.3.5 Szintillationszähler	24
3. Methodik	25
3.1 Isotopenverdünnungsanalyse	25
3.2 Hydrolyse des Untersuchungsmaterials	27
3.2.1 Einwiegen der Rattengewebsslyophilisate, der Hefe und der Seeigeleier und -embryonen	27
3.2.2 Herstellung einer ¹⁴ C-markierten Uracillösung	29
3.2.3 Vorbereitung der Proben und Hydrolyse	30
3.2.4 Extraktion der Hydrolysate	30

3.3 Vorreinigung der Hydrolysate an Ionenaustauschern	30
3.3.1 Herstellung eines NH_4^+ -Formiatpuffers	30
3.3.2 Präparation der Anionenaustauschersäule	31
3.3.3 Bestimmung Uracil - haltiger Fraktionen	31
3.4 Hochdruckflüssigchromatographie	32
3.4.1 Präparation der Hochdrucktrennsäule	32
3.4.2 Durchführung der Trennungen im Hochdruckflüssigsystem	32
3.4.3 Herstellung von Uracil- und Thymin-Eichlösung	33
3.4.4 Identifizierung und Quantisierung des Uracils	33
3.4.5 Bestimmungsgang des Uracilgehaltes in den Proben	34
4. Ergebnisse	35
4.1 Perchlorsäurehydrolyse	35
4.2 Azetonextraktion der Hydrolysate	35
4.3 Verwendung des Hydrolysats ohne weitere Reinigung	36
4.4 Vorreinigung der Hydrolysate an Anionenaustauschern	36
4.5 Konzentrierung der vorgereinigten Analysenlösungen	38
4.6 Bestimmung der Ausbeuten	40
4.7 Hochdruckflüssigchromatographie	40
4.7.1 Trennparameter	40
4.7.1.1 Säulentemperatur	40
4.7.1.2 pH-Abhängigkeit der Auftrennung	41
4.7.1.3 Puffermolarität	41
4.7.1.4 Durchflußgeschwindigkeit	42
4.7.2 Endgültige HPLC-Trennbedingungen	43
4.8 Uracilgehalte der Rattengewebshydrolysate und der Hefeproben	43
4.9 Uracilgehalte der Seeigeleier und -embryonen	59
4.10 Fehlerrechnung	59
5. Diskussion	60
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis	72
8. Lebenslauf	82

1. Einleitung

1.1 Entwicklung der Nukleinstureanalytik

Die ersten Mitteilungen über Nukleinsturen erfolgten durch den Schweizer Friedrich Miescher im Jahre 1871 (52, 53). Ihm war es gelungen, aus Eiter eine bis dahin unbekannte phosphorhaltige Substanz zu isolieren. Da das Ausgangsmaterial relativ große Mengen Kerne weißer Blutkörperchen enthielt, bezeichnete Miescher die von ihm isolierte Substanz als Nuklein. Im Verlaufe weiterer Untersuchungen verwendete er Lachssperma als Ausgangsmaterial und isolierte daraus neben dem Nuklein ein Protein, das Protamin, welches im Gegensatz zum sauren Nuklein stark basischen Charakter aufwies (54). In den nächsten Jahren bis 1881 gelangen im Nuklein Nachweis und Reinigung der Purinkörper Adenin und Guanin (61, 41). Die Pyrimidinkörper Thymin, Cytosin und Uracil wurden erst wesentlich später entdeckt, nämlich 1893 (42), 1902 (43) und 1900 (2).

Als weitere Bestandteile des Nukleins konnten neben diesen Basen und dem bereits von Miescher (52) nachgewiesenen Phosphor auch Zucker, und zwar Pentosen, aufgefunden werden, die zunächst im Jahre 1909 von Levene und Jacobs (45, 46) als Ribose und im Jahre 1930 von Levene et al. (47) als 2'-Desoxyribose identifiziert wurden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führten zur Klassifizierung der Nukleinsturen in Pentosenukleinsture und Desoxypentosenukleinsture. Erstere konnte in großen Mengen aus Hefe gewonnen werden und wurde daher als Hefenukleinsture bezeichnet. Letztere fand sich in großen Mengen in Thymusgewebe und erhielt daher die Bezeichnung Thymonukleinsture.

Da die meisten der aus pflanzlichen Geweben (4, 38, 59) isolierten Nukleinsturen in ihrer Zusammensetzung der Pentosenukleinsture, viele der aus tierischen Geweben (14, 16, 17) isolierten Nukleinsturen hingegen der Desoxypentosenukleinsture entsprachen, wurde die Vermutung ausgesprochen, daß erstere für Pflanzen, letztere für Tiere charakteristisch sei.

Diese Einteilung konnte jedoch im weiteren Verlauf der Untersuchungen vor allem tierischer Gewebe nicht aufrecht erhalten werden, da insbesondere durch die Arbeiten von Feulgen (19), Hammarsten (29) und Jorpes (36) pentosehaltige Polynukleotide in Pankreasgewebe und später auch in Leber, Niere und in Hühnerembryonen nachgewiesen werden konnten.

Andererseits gelang der Nachweis von Desoxypentosenukleinsäure in pflanzlichen Geweben (14, 20). Die von Feulgen (20) entwickelte Methode zum Nachweis von Desoxyribonukleinsäure mit fuchsin-schwefliger Säure, auch Nuklealreaktion genannt, bewies zudem die ausschließliche Lokalisation der Desoxyribonukleinsäure im Zellkern.

Ribonukleinsäure konnte mit einer von Brachet (7) unter Verwendung von Ribonuklease entwickelten histochemischen Testmethode im Zellzytoplasma nachgewiesen werden. Unterstützt wurden diese Befunde durch die von Caspersson (12) entwickelte quantitative Spektrophotometrie mit ultraviolettem Licht, die den Nachweis von feulgennegativer Nukleinsäure im Zytoplasma ermöglichte.

Wichtige Einblicke in die komplexe Struktur der Nukleinsäuren erbrachten die Arbeiten von Chargaff (15) und anderen. Sie wiesen nach, daß in Desoxyribonukleinsäuren die Basen Guanin und Cytosin einerseits und Adenin und Thymin andererseits in jeweils gleichen molaren Mengen auftreten und daß im Gegensatz dazu die Desoxyribonukleinsäuren verschiedener Herkunft starke Schwankungen des (G + C)-Gehaltes aufweisen können, so daß das Verhältnis (A+T)/(G+C) Werte annehmen kann, die größer, kleiner oder gleich 1 sind. Außerdem galt die lange bekannte Tatsache, daß sich Thymin (fast) ausschließlich in Desoxyribonukleinsäure (DNS, engl. DNA), Uracil hingegen ausschließlich in Ribonukleinsäure (RNS, engl. RNA) findet.

Die von Chargaff und Mitarbeitern nachgewiesenen Basenverhältnisse und das in der DNA gefundene konstante Verhältnis von Base : Zucker : Phosphat (1 : 1 : 1) führten zusammen mit einer Vielzahl von physikalisch-chemischen Daten wie elektrometrischer Titration von Mono- und Oligonukleotiden (27), Identifizierung der Phosphodiesterbindung und Entwicklung der Röntgenstrukturanalyse (3, 60) zu der von Watson und Crick (81) postulierten Doppelhelixstruktur der DNA.

Im Gegensatz dazu findet sich die RNA des Zytoplasmas in der Regel als einsträngiges Molekül, das unter anderem durch Schleifenbildung Basen-paarungen ausbilden und daher streckenweise Doppelhelixstruktur aufweisen kann. Abweichungen von den bisher genannten Regeln sind in recht weitem Umfang bekannt. So enthalten einige RNA-Typen geringe Mengen Thymin, gewisse bakterielle Phagen enthalten DNA mit ungewöhnlichen Pyrimidin-basen wie 5-Hydroxymethyluracil und -cytosin, es finden sich ferner Viren mit einsträngiger DNA ebenso wie solche mit doppelsträngiger RNA.

Während DNA den Träger der genetischen Information darstellt, dient die RNA zur Umsetzung dieser genetischen Information in die Aminosäuresequenz von Proteinen.

1.2 Quantitative Bestimmung von DNA und RNA

Im allgemeinen ist der DNA-Gehalt der Zellen eines Individuums bzw. einer Spezies konstant. Große Schwankungen finden sich jedoch im RNA-Gehalt, und zwar in Abhängigkeit von verschiedenen biologischen Parametern wie Alter und Ernährungszustand.

Der quantitative Nachweis von DNA und RNA in pflanzlichen und tierischen Geweben gestaltet sich im allgemeinen recht schwierig, da die zur Verfügung stehenden Nachweismethoden relativ unempfindlich und stör anfällig sind. Die Bestimmungsmethoden erfassen die drei Grundbausteine der Nukleinsäuren, nämlich Basen, Zucker und Phosphat.

Die Phosphatbestimmungsmethode nach Allen (1) basiert auf der Freisetzung des Phosphats mit heißer, konzentrierter Säure und seiner Umsetzung mit Molybdänsture. Das Reaktionsprodukt zeigt nach Reduktion eine Blaufärbung. Allerdings ist der entstehende Farbstoff relativ instabil. Dies führte zur Entwicklung modifizierter Verfahren, die sich durch Bildung eines stabilen blauen Farbstoffs auszeichnen (26,55).

Die Erfassung der Zuckeranteile erfolgte durch die von Mejbaum (51) entwickelte Methode zur Bestimmung der Pentosen mit Orcinol und der von Dische (18) entwickelten Methode zur Erfassung der Desoxypentose mit Diphenylamin. Die Eigenschaft der Purin- und Pyrimidinbasen, ultraviolettes Licht im Bereich von 220 bis 350 nm zu absorbieren, liefert die Grundlage zu der heute am weitesten verbreiteten Methode zur Erfassung dieser DNA-

und RNA-Bausteine. Besondere Aufmerksamkeit erfordert dabei die Abhängigkeit des Absorptionsspektrums vom aktuellen pH-Wert der Analysenlösung, wie dies bereits 1930 von Holiday (31) beschrieben wurde. Durch die grundlegenden Arbeiten von Boarland and McOmie (6), Brown and Short (10), Shugar and Fox (71), Cavalieri et al. (13), Vischer und Chargaff (77), Loring et al. (48) und Volkin und Cohn (78) sind heute die Absorptionsspektren der Purin- und Pyrimidinbasen, ihrer (Desoxy-)Ribonukleoside und (Desoxy-)Ribonukleotide bekannt und können zur quantitativen Analyse herangezogen werden.

Die ersten verlässlichen Methoden zur Erfassung des Nukleinsäuregehaltes in pflanzlichen und tierischen Geweben stammen von Schmidt und Thannhauser (64), Schneider (65) und im Hinblick auf die Untersuchung kleiner Gewebsmengen mit einem Nukleinsäuregehalt unter 1 µg von Ogur und Rosen (58).

Alle drei Methoden verwenden eine Vorreinigung des Untersuchungsmaterials zur Beseitigung phosphathaltiger Lipide und nicht-nukleotidgebundenen Zuckers. Bei der Methode von Schmidt und Thannhauser (64) erfolgt nach Abtrennung des Überwiegenden Teils der Proteine und Lipide eine alkalische Hydrolyse der RNA in 1 N NaOH oder KOH. Man macht sich also hier die unterschiedliche Resistenz beider Nukleinsäurearten gegen stark alkalische und stark saure Lösungsmittel zunutze. Denn RNA wird unter dem Einfluß von 1 N NaOH oder 1 N KOH in Ribonukleotide gespalten, DNA hingegen nicht.

Umgekehrt sind die N-glycosidischen Bindungen der Purinbasen mit der 2'-Desoxyribose gegen die Einwirkung starker Säuren sehr instabil. Es kommt zur Depurinisierung der DNA (Apurinsäure). Nach Fällung des Analysenansatzes mit Perchlorsäure wird die hochmolekulare DNA zusammen mit verbliebenen Proteinen abzentrifugiert. Im Überstand finden sich die säurelöslichen, niedermolekularen Spaltprodukte der RNA.

Die Ribonukleotide im Überstand und die DNA im Niederschlag können dann getrennt quantitativ erfaßt werden, meist mit Hilfe einer Phosphatbestimmung. Fehlerquellen ergeben sich hierbei hauptsächlich durch den Verlust von Nukleinsäuren beim Gewebsaufschluß und durch phosphathaltige Rückstände, insbesondere Phosphoproteide.

In der von Schneider (65) entwickelten Bestimmungsmethode werden Ribonukleinsäuren und Desoxyribonukleinsäuren zunächst gemeinsam extrahiert und anschließend durch saure Hydrolyse in freie Basen, Zucker und Phosphat gespalten. Die Unterscheidung der beiden Nukleinsäurefraktionen erfolgt dann mit Hilfe der spezifischen Farbreaktionen auf Pentose (51) und Desoxypentose (18).

Die von Ogur und Rosen (58) zur Bestimmung kleiner Nukleinsäuremengen entwickelte Methode berücksichtigt in größerem Umfang die Entfernung interferierender Gewebsbestandteile. Dies erfordert insbesondere eine gründlichere Vorreinigung der zur untersuchenden Gewebe durch Alkohol- und Alkohol-Äther-Extraktion, sowie Extraktionen mit niedrigmolarer kalter Perchlorsäure. Im nukleinsäurehaltigen Rückstand wird Ribonukleinsäure nach mehrstündiger PCA-Hydrolyse bei 4°C in Form säurelöslicher Spaltprodukte mit Hilfe der UV-Spektrophotometrie bestimmt. Die DNA-Bestimmung erfolgt nach kurzer Hydrolyse in heißer PCA mit der Diphenylamin-Reaktion nach Dische (18).

Die genannten drei Bestimmungsmethoden sind unter Berücksichtigung der Herkunft des zu untersuchenden biologischen Materials vielfach modifiziert worden. Darüber soll an dieser Stelle nicht berichtet werden.

Ein weiteres, von den oben genannten abweichendes Verfahren zur Ermittlung des Nukleinsäuregehaltes pflanzlicher und tierischer Gewebe wurde von McDonald (50) beschrieben. Jervell et al. (34, 35) berichten über die Bestimmung von Nukleinsäuren durch Erfassung ihrer Leitbasen, nämlich des Uracils für RNA und des Thymins für DNA. Dabei ist von Vorteil, daß auf eine Vorreinigung der zu untersuchenden Gewebe weitgehend verzichtet werden kann.

Eine Hydrolyse des Untersuchungsmaterials in konzentrierter Ameisensäure bei 175°C (77) bzw. in 70%iger PCA bei 100°C (49) dient zur quantitativen Freisetzung des Thymins bzw. des Uracils. Die entstehenden Brünungsprodukte beeinträchtigen die anschließende quantitative Erfassung der beiden Leitbasen unter Umständen erheblich, so daß spezielle Reinigungsschritte der eigentlichen Bestimmung vorgeschaltet werden müssen. Die quantitative Bestimmung erfolgt dann mit Dünnschicht- oder Ionenaustauschchromatographie oder, nach Derivatisierung, gaschromatographisch.

Dabei wird die zuerst von Solomon (74) zur Bestimmung dieser Basen in die Nukleinstüreeanalytik eingeführte Isotopenverdünnungsanalyse zur Ermittlung der Ausbeuten herangezogen. Ferner ist bei der Ermittlung des Desoxyribonukleinstüreegehaltes in Geweben bei dieser Methode die genaue Kenntnis der Basenzusammensetzung, also des $(A+T)/(G+C)$ -Quotienten unumgänglich. Bei Ribonukleinstüreeanalysen kann von einem äquimolaren Verhältnis in der Zusammensetzung der Basen ausgegangen werden.

Auf der Basis der von Sasaki und Hashizume (63), Gehrke und Ryle (24), Hashizume und Sasaki (30), Gauchel et al. (51) und Lakings und Gehrke (44) entwickelten gaschromatographischen Methoden zur Erfassung der DNA- und RNA-Basen sollte eine Uracil-Bestimmung in biologischem Material entwickelt werden, die nach dem Vorbild der von Gauchel et al. (22, 23) beschriebenen Arbeiten mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie an stark sauren Kationenaustauschern durchgeführt werden kann.

Die beschriebenen gaschromatographischen Verfahren sind hochempfindlich, benötigen jedoch auf Grund der notwendigen Derivatisierung mindestens 10 bis 20 mg lyophilisierten Gewebes, was etwa 0,1 g Frischgewebe entspricht.

Es wird nachfolgend ein Verfahren beschrieben, das eine exakte Bestimmung des Uracilgehaltes in lyophilisierten Gewebeproben bis hinab zu 0,5 mg ermöglicht. Die chromatographische Bestimmung der daraus extrahierbaren Uracilmengen erfordert, auch bei Erzielung hoher Ausbeuten, hochempfindliche UV-Detektoren zusammen mit Chromatographiesystemen hoher Trennleistung, die überdurchschnittliche Reproduzierbarkeit gewährleisten.

Der Einsatz eines solchen Verfahrens bei der routinemäßigen Bestimmung des Ribonukleinstüreegehaltes in Geweben unterschiedlichster Herkunft erscheint zudem nur dann sinnvoll, wenn die Aufbereitung und Vorreinigung der Proben in Parallelansätzen durchgeführt werden kann und die chromatographische Darstellung des Uracils, das in einer Probe enthalten ist, innerhalb einer Stunde abgeschlossen werden kann.

Das Verfahren der Wahl stellt unter diesem Gesichtspunkt die Hochdruckflüssigchromatographie an Kationenaustauschern dar, da dieses alle oben genannten Anforderungen erfüllt und es zudem erlaubt, das Uracil ohne vorherige Derivatisierung in einem wäßrigen System zu bestimmen.

1.3 Hochdruckflüssigchromatographie

Seit der ersten Beschreibung von Phänomenen, die eine Trennung komplexer Substanzgemische auf der Grundlage unterschiedlicher Adsorptionsaffinitäten an Kieselgelen ermöglichten und von ihrem Entdecker Tswett (76) als Chromatographie bezeichnet wurden, ist in der Literatur eine unüberschaubare Fülle chromatographischer Trennmethoden beschrieben worden (80, 82).

Prinzipiell handelt es sich bei der Chromatographie um eine physikalische Methode der Stofftrennung mit Hilfe zweier Phasen, deren eine ruht, sogenannte stationäre Phase, und deren andere sich fortbewegt, sogenannte mobile Phase.

Große Fortschritte auf dem Gebiete der Chromatographie wurden jedoch nicht so sehr durch die Fülle publizierter Verfahren erzielt, von denen jedes meist ein spezielles Trennproblem behandelt, sondern vielmehr durch die praktische Entwicklung und eingehende theoretische Darstellung neuer Chromatographietechniken, wie dies mit der Einführung der Verteilungschromatographie in den vierziger Jahren, der Gas- und Dünnschichtchromatographie in den fünfziger und der Gelchromatographie in den sechziger Jahren der Fall war.

Mit Hilfe dieser Verfahren war vor allem auf biochemischem Gebiet die Trennung und quantitative Erfassung sowohl niedermolekularer als auch sehr hochmolekularer Substanzen bis hin zu den Nukleinsäuren in der Größenordnung von Milligramm- bis Mikrogramm-Quantitäten möglich.

Ein zunächst unüberbrückbar erscheinender Unterschied besteht jedoch zwischen der herkömmlichen (konventionellen) Flüssigchromatographie und der schnellen Chromatographie in der Gasphase, insbesondere hinsichtlich der Probenvorbereitung, der Schnelligkeit der Analysendurchführung, des Auflösungsvermögens und der Möglichkeit des Einsatzes unterschiedlicher Detektionssysteme. Das gute Auflösungsvermögen und die schnelle Durchführbarkeit der Analysen begünstigen einerseits die Anwendung der Gaschromatographie, andererseits erweist sich die insbesondere bei biochemischen Untersuchungen notwendige Derivatisierung geladener oder polarer Moleküle in hochunpolare Substanzen, welche erst so in den gasförmigen Zustand überführt werden können, ebenso als Nachteil gegenüber der Flüssigchromatographie wie der beschränkte Einsatz von Detektionssystemen. Dabei bereiten insbesondere die Derivatisierung

und die genaue Ermittlung der dabei erzielten Ausbeuten für quantitative Analysen die größten Schwierigkeiten.

Die Schließung dieser Lücke, und somit die Verbindung derjenigen Parameter, die in der Gaschromatographie hohe Auflösung und schnelle Durchführung ermöglichen, mit denen, die es ermöglichen eine Derivatisierung zu umgehen, nämlich die Verwendung einer flüssigen mobilen Phase, und die Detektion variabel zu gestalten, gelang mit der Entwicklung der schnellen Flüssigchromatographie, die im allgemeinen als Hochdruckflüssigchromatographie bezeichnet wird, ab 1968.

An Hand der nachfolgenden Darstellung der wichtigsten Parameter, die bei Säulenchromatographiesystemen herkömmlicher Art über eine hohe Auflösung entscheiden, können die Erfordernisse an die Technologie der Hochdruckflüssigchromatographiesysteme leicht abgeleitet werden.

1.3.1 Grundlagen der konventionellen Chromatographieverfahren

Die nachstehende Abbildung 1 zeigt die wichtigsten Parameter, die nach der vollständigen Trennung zweier in einem säulenchromatographischen System retinierten Substanzen A und B dem Elutionsdiagramm entnommen werden können.

Die Trennung zweier Substanzen A und B, d. h. der Grad der Auflösung ihrer Banden im Elutionsdiagramm, kann nach folgender Formel ermittelt werden (25)

$$R_s = \frac{2(t_B - t_A)}{(W_A + W_B)} \quad .$$

Der Trennfaktor R_s kann somit Werte zwischen 0 ($t_A = t_B$) und einer beliebigen Größe annehmen ($(t_B - t_A) \leq 1/2 (W_A + W_B)$). Ein R_s -Wert von 1 ist für analytische Arbeiten unter quantitativen Anforderungen an das System ausreichend, sofern beide Komponenten A und B in etwa gleicher Konzentration vorliegen und die spezifischen Detektionsparameter, z.B. die Extinktionskoeffizienten bei 254 nm, sich ungefähr entsprechen (37).

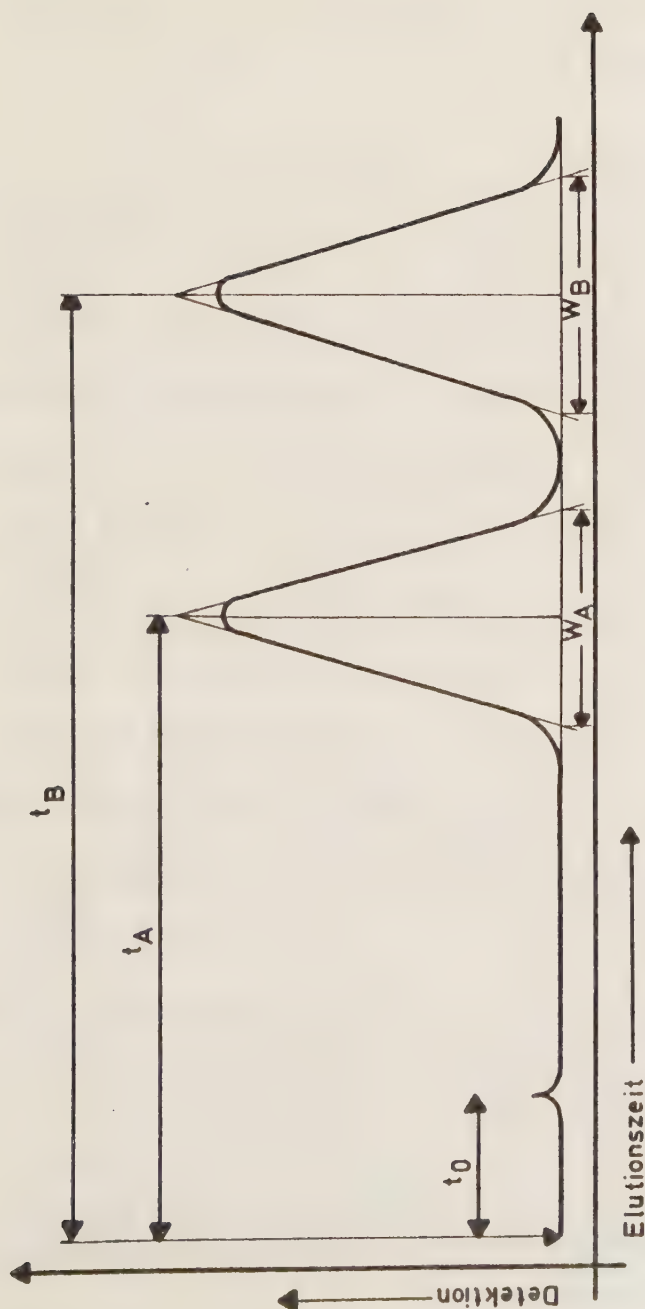


Abbildung 1: Parameter eines Elutionsdiagramms

(t_0 = Elutionszeit einer nicht retinierten Komponente, t_A = Elutionszeit einer retinierten Komponente A, t_B = Elutionszeit einer retinierten Komponente B, W_A = Bandenbreite der Komponente A, W_B = Bandenbreite der Komponente B, die Werte können wahlweise in min, cm oder ml angegeben werden)

Diese Zusammenhänge lassen sich auch unter Verwendung des Wertes der Standardabweichung σ einer Gauss-verteilten Kurve darstellen. Da die Bandenbreite einer solchen Kurve $W = 4\sigma$ beträgt, kann der Trennfaktor auch ausgedrückt werden als

$$R_s = \frac{(t_B - t_A)}{4\sigma}.$$

Für den Fall, daß $R_s = 1$ wird, bezeichnet man die Trennung auch als 4σ -Trennung. Da jeder Bandenbreite 4σ entsprechen, finden sich innerhalb dieses Wertes entsprechend der Definition einer symmetrischen Verteilung 98% aller Teilchen der jeweils betrachteten Substanz A oder B. Die Überlappung der Banden beträgt somit lediglich 2%, was die oben gemachten Ausführungen hinsichtlich der Anwendungsmöglichkeiten bei quantitativen Analysen erklärt.

Die Trennung der Bandengipfel, d.h. die Differenz $(t_B - t_A)$, ist direkt proportional zu dem in der Trennstüle zurückgelegten Trennweg L, der der Säulenlänge entspricht. Die Bandenverbreiterung σ hingegen ist proportional der Quadratwurzel des Trennweges. Dies bedeutet, daß die Trennung der beiden Banden in einer Säule schneller erfolgt als die Bandenverbreiterung. Längere Säulen weisen daher prinzipiell eine bessere Trennleistung auf.

Es darf jedoch nicht unberücksichtigt bleiben, daß bei der Verwendung längerer Säulen die Retentionszeit, t_A bzw. t_B , proportional zur Säulenlänge, und somit proportional zum Trennweg, zunimmt, was eine zusätzliche Bandenverbreiterung durch Diffusion bewirkt. Ein durch eine Säulenverlängerung angestrebter besserer Trenneffekt kann daher auf Grund der damit verbundenen zeitabhängigen Diffusionszunahme wieder zunichte gemacht werden.

Der Zusammenhang zwischen Säulenlänge und Bandenbreite (entsprechend 4σ) kann mit Hilfe der sogenannten theoretischen Bodenhöhe dargestellt werden (25)

$$H = L \cdot \frac{\sigma^2}{t_r^2}$$

Dabei bedeuten H die theoretische Bodenhöhe, L die Säulenlänge, σ die Standardabweichung der Bande und t_r die Retentionszeit (vergleichbar t_A und t_B in Abbildung 1).

Eine geringe theoretische Bodenhöhe erlaubt im allgemeinen die angestrebte Trennung zweier Substanzen auf einer relativ kurzen Säule.

Der Wert für σ^2/t_r^2 ist auf einer kurzen Trennsäule zwar relativ klein, da aber die Retentionszeit t_r proportional zur Säulenlänge, die Standardabweichung der Bande, σ , aber nur proportional zur Quadratwurzel der Säulenlänge L ansteigt, mußte sich theoretisch eine überaus große Säulenverlängerung günstig im Sinne einer Abnahme der theoretischen Bodenhöhe H auswirken.

Die in der Trennsäule auftretenden Diffusionsphänomene überlagern jedoch, wie bereits oben ausgeführt wurde, diese Abhängigkeit. Die Standardabweichung der betrachteten Bande nimmt letztendlich schneller zu als nur proportional zur Quadratwurzel der Säulenlänge. Die daraus resultierende starke Zunahme des Quotienten σ^2/t_r^2 führt somit in praxi zu einer überproportionalen Zunahme der Bodenhöhe H entgegen der theoretisch zu erwartenden Abnahme.

Die Verwendung längerer Säulen führt außerdem auch zu einem nicht zu unterschätzenden Anstieg des Druckabfalls in der Säule, was nur durch Verwendung von Säulenfüllmaterialien mit größeren Partikeldurchmessern oder durch Verwendung von Säulen mit größeren Innendurchmessern ausgeglichen werden kann. Dies führt dann jedoch, wie von Halasz und Walking (28) nachgewiesen wurde, bei konventionellen Trennsäulen zu einer Zunahme des Wertes für die theoretische Bodenhöhe. Das Verhältnis von Säulendurchmesser d_s und Partikeldurchmesser d_p muß auf jeden Fall kleiner sein als 5, um eine Verbesserung hinsichtlich des Wertes für die theoretische Bodenhöhe zu erreichen.

Wird in einem Trennsystem auf eine Säulenverlängerung verzichtet, weil die vollständige Trennung zweier Substanzen auch auf der kurzen Säule gelingt, so kann eine wesentliche Verkürzung der Retentionszeit t_r erreicht werden. Dies ist insbesondere für solche Verfahren wichtig, die im routinemäßigen Analysenbetrieb verwendet werden sollen.

Andererseits konnte gezeigt werden (37), daß eine Verbesserung des Wertes für die theoretische Bodenhöhe erzielt wird, wenn der Quotient L/d_p (Säulen-

lenlänge durch Partikeldurchmesser) zunimmt. Über die Säulenlänge wird dieser Ausdruck jedoch mit der Retentionszeit, t_r , und dem Druckabfall, Δp , im Trennsystem verknüpft.

Ein Anstieg des Wertes für L/d_p und somit eine Erhöhung der Anzahl der theoretischen Böden, die eine Verbesserung der Trennung ermöglicht, muß entweder mit der Zunahme der Retentionszeit, t_r , bei gleichem Druckabfall im System oder auf Grund der Abnahme des Partikeldurchmessers, d_p , mit einer Zunahme des Druckabfalls, Δp , bei gleicher Retentionszeit erkauft werden.

In konventionellen Systemen, die meist ohne Pumpen, also lediglich mit der Erdanziehungskraft arbeiten, um das Elutionsmittel durch die Säule zu transportieren, sind somit z.B. Ionenaustauscher mit sehr kleinen Korngrößen (kleiner als $50 \mu\text{m}$), welche eine ausgesprochen gute Auflösung ermöglichen, nicht verwendbar. Denn bei dem dabei möglichen Druckabfall von 0,5 bis 2 m Wassersäule, muß entweder mit extrem kurzen Trennstülen oder inakzeptabel langen Retentionszeiten gearbeitet werden.

1.3.2 Grundlagen der schnellen Flüssigchromatographie (Hochdruckflüssigchromatographie)

Die geschilderten Sachverhalte regten Ende der sechziger Jahre zur Entwicklung einer Technologie an, die es heute ermöglicht, flüssigchromatographische Trennprozesse mit bis dahin nur in der gaschromatographischen Analyse erreichter hoher Auflösung auf solchen Säulen durchzuführen, deren Längen dem speziellen Trennproblem angepaßt sind.

Voraussetzung hierfür waren die Bereitstellung von 1. Präzisionspumpen, die reproduzierbar kleinste (z.T. weniger als $4 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$) Lösungsmittelvolumina unterschiedlicher Viskosität und Zusammensetzung gegen Drücke bis 300 bar transportieren, 2. geeigneter Stülen (meist Stahlkapillaren mit exakten Bohrungen von 1 mm bis 3 mm Durchmesser), Hochdruckdichtungen und -verbindungen mit Totvolumina im Bereich weniger Mikroliter, und 3. Hochdruckinjektionsventile zur Applikation der Proben, deren Volumen zwischen 0,5 und $300 \mu\text{l}$ schwanken kann (68). Zum 4. wurden hochempfindliche, rauscharme UV-Detektoren benötigt mit Meßzelleninhalten zwischen 5 und $25 \mu\text{l}$ und einem Lichtweg von mindestens 1 cm.

Die ersten Untersuchungen, die mit einer Apparatur durchgeführt wurden, welche alle genannten Forderungen erfüllt (LCS 1000 Liquid Chromatograph von Varian Aerograph), stammen von Horvath et al. (33), Burtis und Warren (11), Scott (67) und Horvath und Lipsky (32) aus der Zeit zwischen 1967 und 1969. An Hand von Trennungen synthetischer Gemische aus Nukleotiden und der Untersuchung natürlicher Inhaltsstoffe des menschlichen Urins an Anionenaustauschern wurden die ersten eingehenden Untersuchungen zur theoretischen Grundlage der schnellen Flüssigchromatographie durchgeführt.

Die dabei verwendeten Anionenaustauscher wurden speziell für die Hochdruckflüssigchromatographie entwickelt. Sie bestehen aus einem inerten Glaskern, der mit einer sehr dünnen Schicht Austauschermaterial belegt ist. So werden zwar nur geringe Austauscherkapazitäten erhalten, aber der Druckabfall innerhalb der Säule wird auf ein praktikables Maß (je nach Temperatur zwischen 50 und 200 bar) gesenkt. Denn die Partikeldurchmesser liegen in der Größenordnung von 10 bis 20 μm und die Säulendurchmesser bei meist 1 mm, was sowohl eine gute Permeabilität der Säulen als auch eine geringe theoretische Bodenhöhe gewährleistet.

Entgegen den ersten Untersuchungen, die hauptsächlich an Anionenaustauschern durchgeführt wurden, verlagerte sich das Hauptinteresse auf dem Gebiet der schnellen Flüssigchromatographie innerhalb der letzten fünf Jahre auf Trennsäulen, welche aktivierte Kieselgele als feste stationäre Phase enthalten (72). Da diese Adsorptionssysteme gegen eine Verunreinigung der mobilen flüssigen Phase mit Wasser ausgesprochen empfindlich sind - das Wasser besetzt die SiOH-Gruppierungen und inaktiviert damit die Säule durch Senkung der Adsorptionskapazität - hat sich der Trend zu den sogenannten "reverse phase" Systemen verstärkt und für einige Trennprobleme bereits durchgesetzt.

Bei den "reverse phase" Systemen sind die Oberflächen der Kieselgelpartikel an den SiOH-Gruppierungen mit langen (C_{12} - C_{20}) aliphatischen Kohlenwasserstoffen über Si-O-, Si-N- und Si-C-Brücken verbunden. Trennungen an solchen Austauschern erfolgen durch Elution mit polaren Lösungsmitteln, also z.B. Wasser oder Tetrahydrofuran, denen zunehmend eine unpolare(re) Komponente, also z.B. Methanol (40) oder n-Hexan (70) zugemischt wird.

Die Abfolge der verwendeten Phasen ist in diesen Systemen also umgekehrt, was die Namensgebung für die Systeme erklärt. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, daß "reverse phase" Systeme, die mit modifizierten Kieselgelen arbeiten, mehr und mehr - in Abhängigkeit von der Kettenlänge der aliphatischen Reste - die Charakteristik einer Adsorptionschromatographie verlieren und sich letztendlich wie Verteilungssysteme verhalten.

Für die oben angesprochenen Systeme sind in den letzten Jahren umfangreiche praktische und theoretische Grundlagen erarbeitet worden, ganz im Gegensatz zu den Ionenaustauschsystemen, deren theoretische Behandlung, wohl auf Grund der zu erwartenden höheren Komplexität des Geschehens, sich auf wenige Arbeiten beschränkt (32, 33, 69).

2. Untersuchungsmaterialien, Chemikalien und Geräte

2.1 Untersuchungsmaterialien

2.1.1 Rattengewebe

Jungen Albinoratten, Stamm Wistar, geliefert von der Versuchstierzuchtanstalt in Hannover, wurden in Äthernarkose Herz, Milz, Nieren, Leber und Thymus mit einer in Aceton-Trockeneis auf -60°C tiefgekühlten Gefrierstoppzange entnommen. Die Organe wurden im eisgekühlten Mörser fein zerrieben und sofort für 24 h in eine Gefriertrocknungszentrifuge verbracht. Die erhaltenen Lyophilisate wurden luftdicht verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.2 Bäckerhefe

20 g Bäckerhefe wurden auf -30°C tiefgefroren und nach Lyophilisierung mit den Rattengeweben unter Luftabschluß aufbewahrt.

2.1.3 Seeigeleier und -embryonen

Die Seeigel der Spezies *Sphaerechinus granularis* Lam. wurden im Canale di Leme bei Rovinj, Istrien (Jugoslawien) gefangen. Die Gewinnung der Eier und die Aufzucht der Embryonen erfolgte nach der von Müller et al. (56) beschriebenen Methode.

In jeweils 30-minütigem Abstand wurden den Aufzuchtansätzen ca. 10^5 Embryonen entnommen, in Hydrolyseröhrchen abzentrifugiert und seewasserfrei auf -30°C eingefroren aufbewahrt.

Proben mit unbefruchteten Eiern enthielten ca. 10^6 Eier.

2.2 Chemikalien

2.2.1 Ionenaustauscher

Dowex 1 X 8 - Anionenaustauscher wurde von der Firma Serva, Heidelberg (BRD) bezogen. Stark saurer Kationenaustauscher aus sulfoniertem Styrocopolymer, Typ M71, Partikeldurchmesser 10 - 12 μm , lieferte die Firma Beckman, München (BRD).

2.2.2 Radiobiochemica und Szintillatorflüssigkeit

2-¹⁴C-markiertes Uracil (spezifische Aktivität 7,21 mCi/mMol, entsprechend 15,5 mg/mCi, Lot-No. 80-235) stammte von der Firma NEN-Chemicals, Dreieichenhain (BRD).

Als Szintillatorflüssigkeit diente eine Mischung von 75 mg Dimethyl-POPOP, 4 g PPO und 120 g Naphthalin, gelöst in 1 l Dioxan, modifiziert nach der von Bray (8) angegebenen Mischung.

2.2.3 Feinbiochemica

70% Perchlorsäure p.A., KOH-Plätzchen p.A., 25% Ammoniaklösung p.A., 98% Ameisensäure p.A. und Uracil (für biochemische Zwecke) wurden von der Firma Merck, Darmstadt (BRD) bezogen.

2.3 Apparaturen

2.3.1 Hochdruckflüssigchromatograph (Abbildung 2)

Die hochdruckflüssigchromatographischen Trennungen der Analysenlösungen erfolgten in einem Varian LCS 1000 Liquid Chromatograph, der mit einer Kolbenmembranpumpe der Firma Dosapro, Gießen (BRD) umgerüstet war, um den bei Verwendung der 3 m langen Kationenaustauschersäule auftretenden hohen Gegendruck von ca. 300 bis 350 bar zu überwinden. Der LCS 1000 selbst, ausgerüstet mit einer Milroyal D-Pumpe, verfügt über eine automatische Druckbegrenzung bei 3000 psi (entsprechend etwa 210 bar). Diese Grenze erwies sich bei der Durchführung der beschriebenen Arbeiten als zu niedrig angesetzt.

2.3.2 UV-Detektor für die Hochdruckflüssigchromatographie

Die Detektion der Elutionsdiagramme erfolgte bei 254 nm mit Hilfe eines hochempfindlichen, relativ rauscharmen Doppelstrahl-UV-Photometers, das serienmäßig in den LCS 1000 eingebaut ist. Die Empfindlichkeit der Detektion kann wahlweise auf 0,64, 0,32, 0,16, 0,08, 0,04 oder 0,02 Extinktionseinheiten eingestellt werden. Die dargestellten Elutionsdiagramme wurden meist bei höchster Emp-

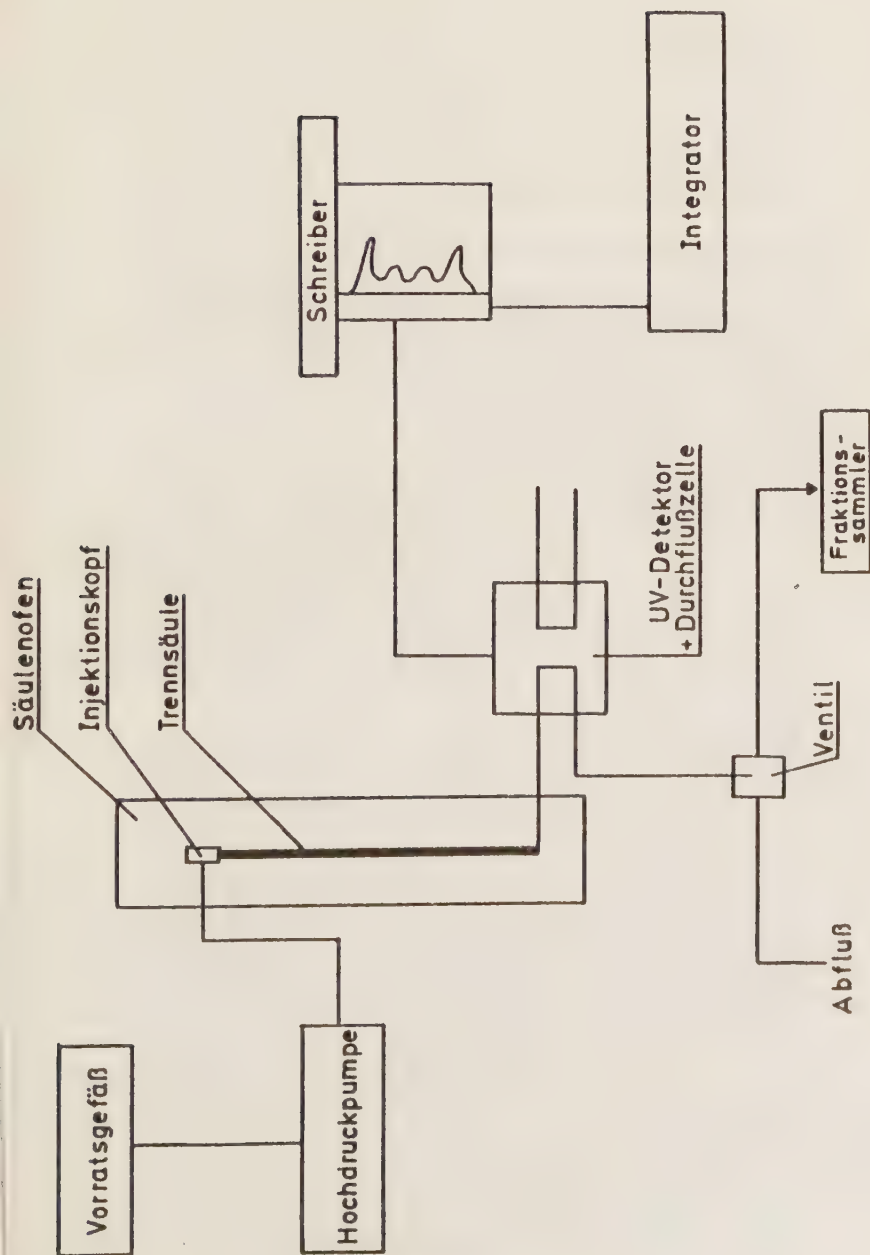


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Hochdruckflüssigchromatographen für isokratische Elutionen

findlichkeit aufgezeichnet. Die Durchflußzelle des Detektors enthält bei 1 cm Lichtweg 8 μ l Meßvolumen. Gemessen wurde grundsätzlich gegen Luft.

Die Durchflußzelle wurde durch einen elektronisch gesteuerten Heizmantel auf eine konstante Temperatur von 40°C eingeregelt. Die Apparatur wurde von Herrn Dipl. Physiker M. Michaelis, Mainz (BRD), angefertigt.

2.3.3 UV-Durchflußschreiber und Fraktionssammler

Zur Vorreinigung der Präparate an Dowex-Anionenaustauscher wurden Durchflußschreiber und Fraktionssammler der Firma LKB-Produkter, Stockholm (Schweden), verwendet.

2.3.4 Kompensationsschreiber und Integrator

Zur Aufzeichnung der Elutionsdiagramme diente ein Kompensationsschreiber der Firma Varian, Modell 20, mit einem span-element von 10 mV. Zusätzlich wurde die Empfindlichkeit des Systems durch einen Operationsverstärker um den Faktor 10 erhöht. Ein Ansteigen des Basisrauschens wurde elektronisch verhindert. Das hierfür notwendige Gerät wurde ebenfalls von Herrn Dipl. Physiker M. Michaelis, Mainz (BRD), angefertigt.

Auf die Potentiometerwelle des Schreibers wurde ein Präzisionspotentiometer (Fa. Beckman, München) mit 3,5 Umdrehungen bei 200 Ohm Innenwiderstand aufgesetzt und mit dem Schleifpotentiometer des verwendeten selbstgebauten Integrators (angefertigt von Herrn Dr. H.-W. Brandt, Leverkusen-Bayerwerk) über eine Wheatstone-Brücke so verbunden, daß die Grundlinie des Elutionsdiagramms jeweils gegen den Schrittmotor des Integrators abgeglichen werden konnte. Die bei Auslenkungen des Kompensationsschreibers auftretenden Spannungsdifferenzen konnten so in Impulse umgesetzt werden, die vom Integrator digital angezeigt wurden.

2.3.5 Szintillationszähler

Die Bestimmung der Radioaktivität in den Analysen erfolgte in einem Liquid-Szintillation-Counter (Tri-Carb) der Firma Packard.

3. Methodik

3.1 Isotopenverdünnungsanalyse

Die quantitative Bestimmung einer Substanz in biologischem Material erfordert entweder die vollständige Isolierung der zu untersuchenden Komponente oder aber eine genaue Kenntnis der erzielten Ausbeute. Da sich Verluste während der zur Isolierung notwendigen Aufarbeitungsschritte in praxi jedoch nicht vermeiden lassen, ist man gezwungen, Verfahren in den Analysengang einzuführen, die eine nachträgliche Ausbeutebestimmung ermöglichen.

Für biochemische Verfahren hat sich dabei insbesondere das Verfahren der Isotopenverdünnungsanalyse bewährt, das zuerst von Solomon (73, 74) in die Nukleinsäureanalytik eingeführt wurde. Diese Technik macht sich die Tatsache zunutze, daß bei Verlust eines gewissen Anteils der zu bestimmenden Substanz ein gleicher prozentualer Anteil des vor Beginn des Analysenverfahrens dem Untersuchungsmaterial zugesetzten radioaktiv markierten, gleichen Materials verloren wird.

Von ausschlaggebender Bedeutung ist dabei einerseits, daß die zugesetzte Menge an radioaktiv markiertem Tracer gegenüber der Menge der im Untersuchungsmaterial vorhandenen, nicht markierten Substanz vernachlässigbar ist. Andererseits muß gewährleistet sein, daß die radioaktive Markierung während der Aufarbeitung nicht aus dem Molekül abgespalten wird, wie dies z.B. bei vielen ^3H -markierten Verbindungen durch Austauschvorgänge bei Behandlung mit konzentrierten Säuren der Fall sein kann. Für die Bestimmung von Substanzen, die wie im vorliegenden Falle heterozyklische Ringe mit hoher Stabilität gegenüber heißen, konzentrierten Säuren enthalten, bietet sich daher eine ^{14}C -Markierung im Ring als sicherstes Verfahren an. In der Abbildung 3 sind die Strukturformeln zweier Uracilmoleküle wiedergegeben, die jeweils entweder mit ^3H (Tritium) - oder aber mit ^{14}C -Atomen substituiert sind.

Die Berechnung der Ausbeute erfolgt unter Kenntnis der dem Ausgangsmaterial zugesetzten und der am Ende des Analysenverfahrens wiedergefundenen Radioaktivität.

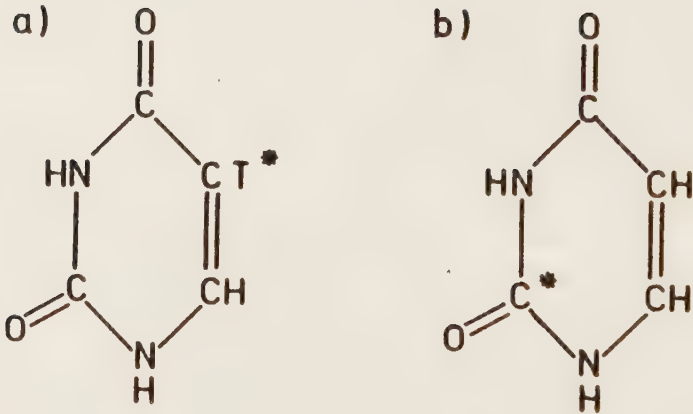


Abbildung 3: Darstellung der Strukturformeln radioaktiv-markierter Uracilmoleküle

(a: ^3H (Tritium)-Markierung, b: ^{14}C -Markierung, während das Tritiumatom alle Wasserstoffpositionen im Molekül einnehmen kann, sog. ubiquitous label, sitzt das ^{14}C -Atom im Ring immer an definierter Stelle, in diesem Fall in Position 2, sog. unique label)

3.2 Hydrolyse des Untersuchungsmaterials

3.2.1 Einwiegen der Rattengewebsslyophilisate, der Hefe und der Seeigeleier und -embryonen

Von jedem Rattengewebe (Herz, Milz, Niere und Thymus) sowie von der Hefe wurden zu verschiedenen Zeiten während der gesamten Untersuchung je fünf Proben Lyophilisat eingewogen. Dabei wurde darauf geachtet, daß ein Wert jeweils zwischen 18 und 22 mg lag, die vier anderen jedoch unter 1 mg, häufig bei 0,5 mg, da das Analysenverfahren insbesondere für die Untersuchung kleiner Probenmengen verwendbar sein sollte.

Folgende Einwaagen wurden in Tischzentrifugenröhrchen verbracht :

Herz	1.	0,81 mg	Milz	1.	0,77 mg
	2.	19,25 mg		2.	20,35 mg
	3.	0,41 mg		3.	0,58 mg
	4.	0,49 mg		4.	0,50 mg
	5.	0,44 mg		5.	0,56 mg
Niere	1.	0,80 mg	Thymus	1.	0,66 mg
	2.	20,15 mg		1.	19,33 mg
	3.	0,55 mg		3.	0,47 mg
	4.	0,42 mg		4.	0,40 mg
	5.	0,47 mg		5.	0,41 mg
Hefe	1.	0,67 mg			
	2.	20,36 mg			
	3.	0,45 mg			
	4.	0,46 mg			
	5.	0,43 mg			

Die Seeigeleier und Embryonen wurden im Institut Ruder Bosković in Rovinj (Jugoslawien) aufgearbeitet und aliquotisiert.

Die Seeigel (*Sphaerechinus granularis* Lam.) wurden im Canale di Leme auf Istrien (Jugoslawien) gefangen. Die Gewinnung der Eier

und die Aufzucht der Embryonen erfolgte entsprechend der von Müller et al. (56) beschriebenen Methode. Weitere Einzelheiten siehe Kapitel 2.1.3.

Während der ersten 13 Stunden nach der Befruchtung wurden insgesamt 21 Proben entnommen. Von jedem Entwicklungsstadium standen 2 Proben zur Verfügung.

RV 22/25/	Entwicklungszeit (min)	Embryo- bzw. Eizahl
2	unbefruchtet	944240
5	unbefruchtet	944240
8	60	101200
9	60	100740
14	75	102520
16	75	101120
19	105	98470
21	105	100300
27	120	100300
28	120	99390
34	150	101560
35	150	102960
38	180	100100
40	180	98740
44	210	100100
46	210	98740
49	240	96970
50	240	99220
55	270	96970
58	270	97870
61	300	100410
62	300	102740
68	330	102740
69	330	102740
73	360	99120
75	360	100960

RV 25/22/	(min)	Eizahl
79	390	99120
80	390	101420
86	420	102740
88	420	101340
92	450	102740
93	450	102270
99	480	99860
101	480	100320
103	510	98040
104	510	100320
110	540	99880
113	540	99880
118	570	98520
120	570	102150
122	600	99880
123	600	99430
129	780	99430
132	780	102150

Die Eier und Embryonen wurden in Hydrolyseröhrchen abzentrifugiert, bei -30°C tiefgefroren nach Deutschland verbracht, aufgetaut und bei 100°C im Trockenschrank eingetrocknet.

3.2.2 Herstellung einer ^{14}C -markierten Uracillösung

Mit einem sauberen Metallspatel wurde ein wenig der radioaktiv markierten Base aus dem Lieferröhrchen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in bidestilliertem Wasser gelöst. Jeweils 10 μl der Lösung wurden mit 100 μl bidestilliertem Wasser und 10 ml Szintillatorflüssigkeit (siehe Kapitel 2.2.2) in ein Szintillatorfläschchen überführt. Nach Bestimmung der Radioaktivität wurde durch Verdünnung der 2- ^{14}C -Uracillösung eine Endkonzentration von etwa 120 000 cpm/ 10 μl hergestellt. Diese Lösung wurde bei

-30°C tiefgefroren aufbewahrt und nur zur Entnahme eines Aliquots kurzfristig aufgetaut. Dabei stieg der Gehalt an Radioaktivität, wahrscheinlich durch geringe Verdunstung bedingt, im allgemeinen in der Lösung leicht an. Daher wurde vor jeder Verwendung erneut ein Aliquot von 10 µl im Tri-Carb gemessen.

3.2.3 Vorbereitung der Proben und Hydrolyse

Die eingewogenen Rattengewebe und die Hefe wurden ebenso wie die Seeigeleier und -embryonen mit je 0,5 ml 70%iger Perchlorsäure und einem 10 µl Aliquot der 2-¹⁴C-Uracillösung mit etwa $1,2 \cdot 10^5$ cpm versetzt. Dies entsprach nach Kapitel 2.2.2 recht genau 7 500 picoMolen an Uracil. Die Zentrifugengläser bzw. Hydrolyseröhrchen wurden mit Glasaufsätzen verschlossen und für 60 min in ein kochendes Wasserbad verbracht.

3.2.4 Extraktion der Hydrolysate

Nach der Hydrolyse wurde jede Probe mit 0,5 ml 7 M KOH im Überschuß neutralisiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min im Eisbad gehalten und das ausgefällte Kaliumperchlorat sodann in einer Tischzentrifuge sedimentiert.

Der Überstand wurde abdekantiert (Analysenlösung I), der Niederschlag mit 1 ml bidestilliertem Wasser reextrahiert, erneut zentrifugiert und der Überstand (Analysenlösung II) mit der Analysenlösung I vereinigt. Der Perchloratrückstand wurde verworfen.

Die vereinigten Analysenlösungen (Gesamtanalysenlösung), durchschnittlich etwa 1,5 bis 1,8 ml, wurden dann an Anionenaustauschern vorgereinigt.

3.3 Vorreinigung der Hydrolysate an Ionenaustauschern

3.3.1 Herstellung eines NH₄-Formiat-Puffers

Der zur Elution verwendete 0,1 Mol/l Ammoniumformiat-Puffer, pH 4,6, wurde aus einem 1 Mol/l Stammpuffer durch Verdünnung 1 : 10 hergestellt.

Der Stammpuffer wurde durch Titration von 80 ml 96 - 100%iger Ameisensäure in 500 ml bidestilliertem Wasser im Eisbad mit 25%iger Ammoniaklösung erhalten. Nach Angleichung der Pufferlösung an die Zimmertemperatur (25°C) wurde auf pH 4,6 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt

3.3.2 Präparation der Anionenaustauscherstüle

20 g Dowex 1 X 8 - Anionenaustauscher (200 - 400 mesh) wurden mit 100 ml 0,5 N HCl gewaschen, über eine Fritte abgezogen und mit bidestilliertem Wasser durchgespült, bis der pH-Wert des Durchlaufs 6,0 erreichte. Der Austauscher wurde dann in 100 ml 0,5 N NaOH suspendiert, über eine Fritte abgezogen und mit Wasser nachgewaschen, bis der Durchlauf neutral war.

Eine Glasstüle (15 x 0,6 cm) wurde mit dem gereinigten Austauscher bis zu einer Höhe von 13 cm gefüllt (Trennbettvolumen etwa 3,7 ml). Die Stüle wurde dann für 1 h mit 0,1 Mol/l Ammoniumformiat-Puffer, pH 4,6, δ quilibriert, und die Durchflußgeschwindigkeit auf $2,4 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ($40 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$) eingestellt.

Die Analysenlösungen (vereinigte Überstände aus 3.2.4), jede mit einem Volumen von etwa 1,5 bis 1,8 ml, wurden auf die Stüle verbracht und das Eluat während 30 Minuten in 10 Fraktionen zu je 2 ml fraktioniert.

3.3.3 Bestimmung Uracil-haltiger Fraktionen

50 μ l jeder Fraktion wurden mit 100 μ l bidestilliertem Wasser und 5 ml Szintillatorlösung versetzt. Anschließend erfolgte die Aktivitätsbestimmung jeder Probe im Tri-Carb Szintillationszähler für 0,1 Minute. Fraktionen mit einer Aktivität über 500 cpm wurden vereinigt und unter N_2 in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5 ml Inhalt) zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 200 μ l 0,01 M Ammoniumformiat-Puffer, pH 4,6, aufgenommen. Diese Lösung diente zur hochdruckflüssigchromatographischen Untersuchung.

3.4 Hochdruckflüssigchromatographie

3.4.1 Präparation der Hochdrucktrennstülen

10 g stark saurer Kationenaustauscher, Typ M71, wurden in 100 ml 0,5 N HCl suspendiert, über eine Fritte gezogen und so lange mit bidestilliertem Wasser gespült, bis der Durchlauf neutral war. Anschließend wurde in 0,5 N NaOH suspendiert und gleich verfahren. Der gereinigte Austauscher wurde dann in 1 l 0,4 M Ammoniumformiat-Puffer, pH 4,6, suspendiert und über Nacht absetzen lassen.

Die Trennstüle (3 m x 1,8 mm) wurde mit einem Stülenendstück verschlossen (Sintermaterial mit einer Porenweite von 0,5 μm) und anschließend mit dem Elutionspuffer, 0,01 M Ammoniumformiat, pH 4,6, gefüllt. Sie wird dann an ein 1 m langes Rohr mit einem inneren Durchmesser von 4,5 mm angeschlossen. Das weite Rohr wird mit einer konzentrierten Aufschlämmung des äquilibrierten Austauschers schnell gefüllt und an das Hochdrucksystem angeschlossen. Unter hohem Druck (etwa 350 bar) werden die Austauscherpartikel unter schnellem Fluß des Elutionspuffers in die eigentliche Trennstüle befördert und hier gepackt, so daß keine Auftrennung nach Partikelgröße eintreten kann, wie das z.B. bei Säulenfüllmethoden mit Hilfe der Gravitation meist der Fall ist. Eine solche Entmischung muß vermieden werden, da durch sie die Auflösungseigenschaften der Trennstüle in hohem Maße negativ beeinflusst werden (79). Methoden, die sich zum Füllen von Hochdruckflüssigchromatographietrennstülen eignen, wurden von Scott und Lee (69) beschrieben.

Nach einer Packungszeit von 45 Minuten wird die Stüle von der Vorstüle mit weitem Innendurchmesser abgenommen, der überschüssige Austauscher mit der Pumpe aus dem Rohr getrieben und die Stüle im Stülenofen installiert. Anschließend wird die Trennstüle für mindestens 2 Stunden bei der später erforderlichen Durchflußrate äquilibriert.

3.4.2 Durchführung der Trennungen im Hochdruckflüssigsystem

Zur chromatographischen Darstellung des Uracils wurde die Trennstüle (300 x 0,18 cm) bei einer Stülenofentemperatur von 80°C mit einer

Geschwindigkeit von $9,8 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ (entsprechend einer Durchflußrate von $15 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$) vom Elutionsmittel ($0,01 \text{ Mol/l}$ Ammoniumformiat-Puffer, pH 4,6) durchströmt. Der Druckabfall in der Säule lag bei etwa 350 bar.

Das Injektionsvolumen der Analysenlösung, das bei stop-flow auf die Säule aufgegeben wurde, betrug, entsprechend dem Uracilgehalt der Analysenlösung, 0,5 bis $10 \mu\text{l}$.

Zur Injektion wurde eine $10 \mu\text{l}$ Hamilton-Spritze mit 7 cm Kanüle verwendet. Die Volumina wurden direkt in die Oberfläche des Austauscherbettes eingespritzt.

3.4.3 Herstellung von Uracil- und Thymin-Eichlösung

Die zur Quantisierung benötigte Uracil-Eichlösung und die im Elutionsdiagramm als "marker" verwendete Lösung des Thymins wurden durch Einbringen eines Aliquots jeder Base in $0,1 \text{ Mol/l}$ Phosphat-Puffer, pH 7,0, und anschließender Verdünnung der Lösung bis zur Erreichung der angestrebten Konzentration hergestellt. Die Konzentration jeder Lösung wurde dabei durch spektrophotometrische Analyse ermittelt.

Uracil		Thymin	
λ_{max}	= 260 nm	λ_{max}	= 264, 5 nm
ϵ_{260}	= 8200 l/Mol·cm	$\epsilon_{264,5}$	= 7890 l/Mol·cm
pH	= 7,0	pH	= 7,0
E	= 0,328	E	= 0,670
Konz.	= 40 pMol/ μl	Konz.	= 85 pMol/ μl

(Die Daten wurden der Referenz (62) entnommen.)

3.4.4 Identifizierung und Quantisierung des Uracils

Die Identifizierung des Uracils im Elutionsdiagramm erfolgte 1. durch Bestimmung der Radioaktivität im Säulenauslauf, 2. durch Aufstocken der Analysenlösung mit jeweils 2 bis $5 \mu\text{l}$ der Uracil-Eichlösung (Konz. $40 \text{ pMol}/\mu\text{l}$), und 3. durch Bestimmung der Elutionszeit bzw. des Elutionsvolumens (ablesbar in cm auf der Zeitachse des Elutionsdiagramms).

Zur Bestimmung der Uracilmenge wurde die Fläche unter der Uracilbande im Elutionsdiagramm von einem mit dem Kompensationsschreiber gekoppelten Integrator (siehe Kapitel 2.3.4) bestimmt und gegen die Fläche eines Standards (gewonnen durch Injektion von 10 μ l bzw. 5 μ l Uracil-Eichlösung) aufgerechnet, oder es wurde die Gipfelhöhe der Uracilbande zur Berechnung herangezogen, ebenfalls im Vergleich gegen einen Standard. Beide Methoden liefern gleiche Ergebnisse und werden im allgemeinen anderen Bestimmungsverfahren, wie z.B. Höhe x Halbwertsbreite, Planimetrie oder "cut-and-weigh", vorgezogen.

3.4.5 Bestimmungsgang des Uracil-Gehaltes in den Proben

Die Konzentration des Uracils in den untersuchten Geweben und den Seeigeleiern und -embryonen wurde wie folgt bestimmt:

Rattengewebe und Hefe

- a) Bestimmung des Integrationsstandards, d.h., der Gipfelhöhe (in cm), die nach Injektion von 100 pMol Uracil-Eichlösung im Elutionsdiagramm erhalten wird,
- b) Ermittlung der Gipfelhöhe der Uracil-Bande im Elutionsdiagramm, die nach Injektion von 0,5 bis 10 μ l Analysenlösung erhalten wird,
- c) Ermittlung des Uracil-Gehaltes in der Gesamtanalysenlösung, U_{ges} ,
- d) Bestimmung der Ausbeute für den Analysengang jeder einzelnen Probe, A,
- e) Ermittlung des totalen Uracil-Gehaltes, U_{tot} , der Hydrolysate mit Hilfe der Ausbeute und des Wertes für U_{ges} ,
- f) Ermittlung des in den Probeneinwaagen, E, natürlich enthaltenen Uracils, U_{nat} , durch Abzug der zugesetzten 2- ^{14}C -Uracil-Menge,
- g) Ermittlung des Uracil-Gehaltes der Proben pro mg Einwaage, $U_{\text{nat}}/\text{mg E.}$

Seeigeleier und -embryonen

- a) bis f) wie für Rattengewebe und Hefe

- g) Ermittlung des Uracil-Gehaltes der Proben pro Seeigelei bzw. Seeigelembryo, U_{nat}/Ei bzw. $U_{\text{nat}}/\text{Emb.}$

4. Ergebnisse

4.1 Perchlorsäurehydrolyse

Für die vollständige Hydrolyse des lyophilisierten Untersuchungsmaterials (Rattengewebe und Hefe) erwiesen sich für Mengen von 0,5 bis 20 mg 0,5 ml 70%ige Perchlorsäure als ausreichend. Für die Hydrolyse der Seeigeleier und -embryonen wurde in Anbetracht der relativ großen Trocknungsmengen (nach Trocknung im Trockenschrank bei 100°C) für jede Probe 1,0 ml 70%ige Perchlorsäure eingesetzt.

Zusätzlich wurden diese Proben nach der Hydrolyse lichtmikroskopisch kontrolliert. Dabei fanden sich keinerlei Gewebsrückstände. Alle Hydrolysate waren klar und, in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Gewebslyophilisat, hell- bis stark dunkelbraun gefärbt.

Der in den Hydrolysaten verbliebene Perchlorsäureüberschuß wurde durch Zugabe von 0,5 bzw. 1,0 ml 7 M KOH neutralisiert. Dabei wurden die Proben für 30 min im Eisbad gehalten und anschließend bei Zimmertemperatur scharf abzentrifugiert.

Der Überstand diente als Analysenlösung, der Niederschlag wurde mit 1,0 ml bidestilliertem Wasser reextrahiert und nach 30 min im Eisbad wiederum bei Zimmertemperatur scharf abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem ersten vereinigt. Diese Lösung diente als Analysenlösung.

4.2 Acetonextraktion der Hydrolysate

In Anlehnung an frühere Arbeiten zur Bestimmung des Thymins in organischem Material (23) sollte auch bei der Uracil-Bestimmung eine Extraktion der Hydrolysate mit einem Aceton/Wasser-Gemisch (98:2 V:V) verwendet werden, um so die Ausbeute an Uracil wesentlich zu erhöhen. Thymin wie auch Uracil sind in reinem Wasser relativ schlecht löslich, was die Verwendung eines Aceton/Wasser-Gemisches erklärt.

Anschließend an die zweimalige Extraktion mit 1,0 ml des Gemisches wurden die Proben im Sandbad bei 80°C über N₂ zur Trockene eingedampft. Dabei erwies sich das Verfahren aber als nicht anwendbar, da sich dabei ein nicht mehr wasserlöslicher, stechend riechender, zäher, brauner Rückstand bildete.

4.3 Verwendung des Hydrolysates ohne weitere Reinigung

Da das Verfahren routinemäßig anwendbar sein sollte, mußte auf eine zeitraubende Aufarbeitung der Hydrolysate nach Möglichkeit verzichtet werden. Aus diesem Grunde wurden die neutralisierten Hydrolysate aus Kapitel 4.1 direkt zur Hochdruckflüssigchromatographischen Darstellung des Uracils herangezogen. Dabei zeigte sich jedoch, daß sowohl das Uracil als auch das als "marker" verwendete Thymin in den Elutionsdiagrammen kaum von begleitenden Verunreinigungen abgetrennt werden konnte. Somit konnte ein zusätzlicher Reinigungsschritt, wie er mit der Acetonextraktion angestrebt worden war, nicht umgangen werden.

4.4 Vorreinigung der Hydrolysate an Anionenaustauschern

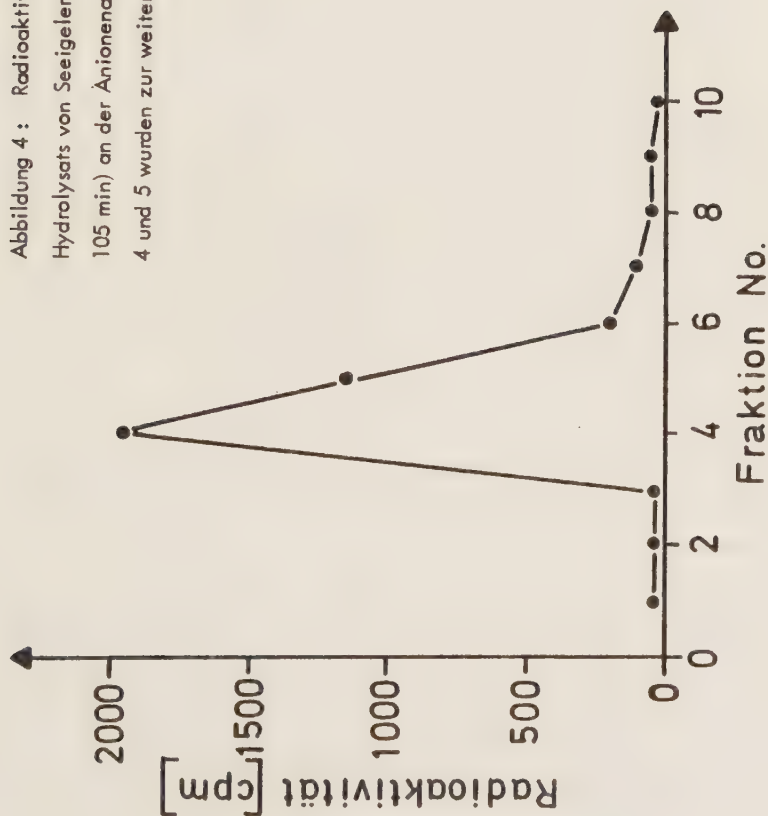
Da der überwiegende Teil der Verunreinigungen auf dem Kationenaustauscher im Hochdruckflüssigchromatographie-System nur leicht retiniert wurde, also bei dem vorliegenden pH-Wert von 4,6 gar nicht oder nur leicht positiv, vielleicht aber auch negativ geladen war, bot sich zur weiteren Vorreinigung der Hydrolysate eine Chromatographie an Anionenaustauschern an.

Dazu wurde eine 15 x 0,6 cm Glasstüle mit Dowex 1X8-Anionenaustauscher (200 - 400 mesh) verwendet. Als Elutionsmittel diente 0,1 Mol/l Ammoniumformiat, pH 4,6. Auf eine Registrierung der Extinktion des Eluats bei 260 nm wurde verzichtet, da das Elutionsdiagramm vermutlich wenig aufschlußreich für die weiteren Untersuchungen sein würde.

Das Eluat wurde in 10 Fraktionen zu je 2 ml fraktioniert. Jeweils 50 µl jeder Fraktion wurden auf Radioaktivität untersucht, da diese am eindeutigsten als Parameter für die Identifizierung Uracil-haltiger Fraktionen dienen konnte. Das Aktivitätsprofil einer solchen Bestimmung ist in Abbildung 4 dargestellt. Jeweils drei oder vier Fraktionen, meist solche mit einer Radioaktivität über 500 cpm, die insgesamt etwa 50 bis 60 % der Gesamtaktivität enthielten, die zu Beginn der Hydrolyse den Proben zugemischt worden war, wurden vereinigt und zur weiteren Analyse herangezogen.

Wurden die Hydrolysate (Volumen 1,5 bis 1,8 ml) so auf die Säulen aufgegeben, wie sie in Kapitel 4.1 gewonnen wurden, so konnten zwar einige Verunreinigungen abgetrennt werden, äußerlich war dies an der Anionen-

Abbildung 4: Radioaktivitätsprofil der Trennung eines Hydrolysats von Seeigelembryonen (Entwicklungszeit 105 min) an der Anionenaustauschersäule. Die Fraktionen 4 und 5 wurden zur weiteren Analyse herangezogen.



austauschersäule jedoch nicht sichtbar. Wurden die Hydrolysate hingegen vor der Aufgabe auf die Säule mit zwei Tropfen 7 M KOH versetzt, so konnte für das freie Auge sichtbar ein Großteil der Verunreinigungen in Form eines braunen Ringes im oberen Teil der Säule retiniert werden. Es bildete sich ein brauner Ring, der auch durch das Elutionsmittel nicht ausgewaschen wurde. Allerdings blieb unklar, auf welchen Mechanismus dieses Phänomen zurückgeführt werden kann. Wahrscheinlich handelt es sich aber um Adsorptionsphänomene und nicht um reinen Ionenaustausch. Da dieses Verfahren die Vorreinigung der Hydrolysate wesentlich förderte, wurde weiterhin mit allen Proben so verfahren.

4.5 Konzentrierung der vorgereinigten Analysenlösungen

Nach Vereinigung der Fraktionen mit ausreichender Aktivität (siehe Kapitel 4.4) wurden Analysenlösungen mit Volumina zwischen 4 und 6 ml erhalten. Diese wurden, um die aktuellen Konzentrationen des Uracils zu erhöhen, zur Trockene eingedampft und in einem definierten Volumen 0,01 Mol/l Ammoniumformiat-Puffer, pH 4,6, aufgenommen.

Die Einengung der Fraktionen erfolgte bis zur Trockene in einem Sandbad bei 70°C unter N₂-Strom. Dabei trat der in Kapitel 4.2 beschriebene, nicht mehr wasserlösliche braune Rückstand nicht auf. Es fielen lediglich große Mengen länglicher Kristalle an, bei denen es sich um Ammoniumformiat handeln kann.

Die Kristalle wurden in der Tischzentrifuge bei Zimmertemperatur scharf abzentrifugiert. Der verbleibende wässrige Überstand wurde dann zur Trockene eingedampft. Der dabei erhaltene pulverige, leicht braun gefärbte Rückstand wurde dann in 60, 110 bzw. 220 µl 0,01 Mol/l Ammoniumformiat-Puffer, pH 4,6, aufgenommen, scharf abzentrifugiert, und vom Überstand genau definierte Volumina, nämlich 50, 100 oder 200 µl mit Hilfe einer Eppendorf-Mikroliterpipette abgezogen.

Diese Lösungen dienten dann als Analysenlösungen für die Hochdruckflüssigchromatographie.

Tabelle 1: Uracil-Ausbeuten der einzelnen Proben von Rattengewebes- und Hefelyophilisaten sowie der Seeigeleier und -embryonen (Angaben jeweils in %)

No.	Herz	Milz	Niere	Thymus		Hefe	
1.	46,7	38,2	34,9	40,2		47,3	
2.	47,4	38,5	39,8	35,2	$\bar{x} = 43,0 \%$	48,1	$\bar{x} = 47,0 \%$
3.	42,0	37,2	42,3	50,6		48,7	
4.	45,8	41,3	49,5	46,8		49,1	
5.	43,3	40,3	47,6	51,9		41,8	

Seeigeleier und -embryonen

No. (RV 25/22)	Ausbeute	No. (RV 25/22)	Ausbeute	
2	45,1	68	22,8	
5	37,5	69	32,5	
8	43,1	73	34,5	
9	31,9	75	40,9	
14	19,5	79	36,8	
16	38,6	80	36,1	
19	44,1	86	46,4	
21	45,7	88	28,1	
27	32,2	92	33,1	
28	31,6	93	35,2	
34	28,4	99	33,5	$\bar{x} = 34,9 \%$
35	44,8	101	27,4	
38	36,8	103	33,2	
40	45,0	104	29,9	
44	42,7	110	33,2	
46	35,9	113	27,8	
49	34,3	118	35,7	
50	35,8	120	31,7	
55	31,0	122	32,0	
58	42,7	123	34,5	
61	17,8	129	41,7	
62	34,4	132	28,4	

4.6 Bestimmung der Ausbeuten

Zur Berechnung der Ausbeute für jede Analysenlösung wurden 10 µl jeder Lösung mit 100 µl bidestilliertem Wasser und 10 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt und im Tri-Carb auf Radioaktivität geprüft.

Die dabei erhaltenen Werte wurden auf das Gesamtvolumen der jeweiligen Analysenlösung, 50, 100 oder 200 µl, umgerechnet. Daraus kann dann unter Kenntnis der zu Beginn der Analyse eingesetzten Radioaktivität die Ausbeute berechnet werden (siehe Kapitel 3.4.5).

Tabelle 1 gibt die Ausbeuten für alle untersuchten Proben aus Rattengewebe, für die Hefe und für die Seeigeleier und -embryonen wieder.

4.7 Hochdruckflüssigchromatographie

4.7.1 Trennparameter

4.7.1.1 Säulentemperatur

Da zu erwarten war, daß zur Abtrennung des Uracils von den begleitenden Verunreinigungen - was immer auch darunter verstanden werden kann - eine mehrere Meter lange Säule verwendet werden mußte, wurde bei der höchsten noch praktikablen Temperatur von 80°C gearbeitet. Oberhalb dieser Temperatur treten nämlich im Durchflußteil des UV-Detektors unvermeidbare Luftblasen auf, deren Ursprung nicht ermittelt werden konnte. Andererseits wird aber die Viskosität der wäßrigen mobilen Phase dadurch so weit erniedrigt als möglich, was eine Verminderung des Druckabfalls in der Säule bewirkt. Bei der schließlich verwendeten 3 m-Säule erreichte der Druckabfall maximal 350 bar, was durch eine hierfür bereitgestellte Orlita-Kolben-Membran-Pumpe überwunden werden konnte, wenn auch häufig Leckagen zwischen Pumpenkopf und Flüssigkeitsteil den Fortgang der Arbeiten hinderten. Die Verwendung von Langhub-Kolbenpumpen erscheint für solche Fälle, da im Bereich oberhalb von 200 bar gearbeitet werden muß, angebracht.

4.7.1.2 pH-Abhängigkeit der Auftrennung

Da Uracil und auch Thymin im pH-Bereich zwischen 1 und 7 ihre Ladung nicht ändern, kann ihre Trennung auf Kationenaustauscherstulen nicht auf ladungsbedingte Austauschvorgänge zurückgeführt werden. Vielmehr spielen hierbei wahrscheinlich Adsorptionsvorgänge eine Rolle, die durch die große Oberfläche des Austauschers, welche durch den sehr geringen Partikeldurchmesser hervorgerufen wird, außerordentlich begünstigt werden.

Ob tatsächlich eine, eventuell sogar pH-abhängige Retention - für die allerdings keinerlei Anhaltspunkte gefunden wurden - auf Grund von Adsorptionseffekten vorliegt, war nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit.

Der pH-Wert wurde, in Anlehnung an andere, bereits existierende Trennverfahren für die Leitbase der DNA, das Thymin, (23) auf 4,6 festgesetzt.

4.7.1.3 Puffermolarität

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, erfolgte die Elution des Uracils unabhängig von der Puffermolarität. Da jedoch die begleitenden Verunreinigungen z.T. ausgesprochen stark in Abhängigkeit von der Puffermolarität retiniert wurden, wurde eine Testreihe mit verschiedenen Puffermolaritäten angesetzt, und zwar mit den Konzentrationen 0,001 Mol/l, 0,005 Mol/l, 0,01 Mol/l, 0,05 Mol/l und 0,1 Mol/l.

Dabei zeigte sich, daß bei Verwendung eines 0,01 Mol/l NH_4^+ -formiat-Puffers, pH 4,6, hinsichtlich der Abtrennung der Begleitsubstanzen vom Uracil die besten Ergebnisse, d.h. freie Darstellung des Uracil-Gipfels im Elutionsdiagramm, erreicht wurden. Somit wurde eine Molarität von 0,01 Mol/l für die weiteren Trennungen im Hochdrucksystem festgesetzt.

4.7.1.4 Durchflußgeschwindigkeit

Der Grad der Auflösung eines Hochdruckflüssigchromatographie-systems hängt neben anderen Parametern, wie Säulenlänge, Partikelgröße des Austauschers, Trenntemperatur und Zusammensetzung der flüssigen mobilen Phase, stark ab von der Durchflußgeschwindigkeit des Elutionsmittels in der Säule.

Wie aus theoretischen Überlegungen und praktischen Untersuchungen abgeleitet werden kann (37), hängt die theoretische Bodenhöhe in einem Trennsystem signifikant ab von der Durchflußgeschwindigkeit. Und zwar sinkt die theoretische Bodenhöhe von einem unvorteilhaft hohen Wert bei ausgesprochen niedrigen Durchflußgeschwindigkeiten zunächst auf ein Optimum ab - erreicht also sehr kleine Werte - und nimmt dann, allerdings ausgesprochen langsam, mit steigender Durchflußgeschwindigkeit wieder zu.

Aus theoretischen Sicht liefert ein Trennsystem optimale Auflösung, wenn im Optimum der theoretischen Bodenhöhe gearbeitet wird. Für routinemäßig durchgeführte Analysen erweist sich die dabei mögliche Durchflußgeschwindigkeit jedoch meist als zu gering, d.h., es ergeben sich unakzeptabel lange Retentionszeiten für die einzelnen Komponenten. Aus diesem Grunde wird unter Verringerung der Auflösung eine Durchflußgeschwindigkeit vorgezogen, die Analysen in angemessener Zeit gestattet.

Bei der Verwendung von Kationenaustauscher mit ausgesprochen kleinem Partikeldurchmesser ist der Verlust an Auflösung jedoch, und das sei ausdrücklich vermerkt, sehr gering und beeinflußt die quantitative Bestimmung von Substanzen nur unerheblich.

Die Abhängigkeit zwischen theoretischer Bodenhöhe und Durchflußgeschwindigkeit ist für das vorliegende Trennsystem in abgewandelter, aber dennoch dafür zutreffender Form bereits durchgeführt worden (23). Entsprechend der dort gefundenen Werte wurde eine Durchflußgeschwindigkeit von $9,84 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ (entsprechend einer Durchflußrate von $15 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$) gewählt.

Die Elution des Uracils sowie des nachfolgenden Thymins und weiterer Bestandteile der Analysenlösung, die jedoch nicht näher untersucht oder identifiziert wurden, konnte dabei innerhalb von 60 min, bei relativ sauberen Analysenlösungen auch bereits nach 45 min abgeschlossen werden. Dabei überschritt der im Hochdrucksystem tolerable Druck nicht den zulässigen Wert. Der Druckabfall in der Säule lag also stets unter 350 bar.

4.7.2 Endgültige HPLC-Trennbedingungen

Die Abtrennung des Uracils erfolgte auf einer 300 x 0,18 cm Säule, gefüllt mit stark saurem Kationenaustauscher, Typ Beckman M71, die von einem 0,01 Mol/l Ammoniumformiat-Puffer, pH 4,6, bei einer Durchflußgeschwindigkeit von $9,84 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ (Durchflußrate $15 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$) und einer Säulenofentemperatur von 80°C durchströmt wurde. Die Diagramme der Trennung zweier Eichsubstanzen sind in Abbildung 5 dargestellt.

4.8 Uracil-Gehalte der Rattengewebslyophilisate und der Hefeproben

Von den in Kapitel 4.5 gewonnenen Gesamtanalysenlösungen wurde ein Aliquot zur hochdruckflüssigchromatographischen Uracil-Bestimmung verwendet. Einige der erhaltenen Diagramme sind in den Abbildungen 6 bis 10 dargestellt. Dann wurde der Uracilgehalt der Gesamtanalysenlösungen bestimmt (U_{ges} in Tabelle 2). Mit Hilfe der Ausbeute jeder Probe (siehe Tabelle 1) wurde der Uracil-Gehalt im Hydrolysat (U_{tot} in Tabelle 2) berechnet. Von diesem Wert mußte die radioaktiv-markierte Uracil-Menge abgezogen werden, die vor der Hydrolyse den Einwaagen zugesetzt worden war (siehe Kapitel 3.2.3). Man erhielt so die wahre, natürlicherweise in der Gewebs- bzw. Hefeeinwaage enthaltene Uracil-Menge (U_{nat} in Tabelle 2). Unter Kenntnis der Einwaage (E in Tabelle 2) konnte daraus der Uracil-Gehalt pro mg Einwaage ($\mu\text{g U/mg E}$ in Tabelle 2) ermittelt werden.

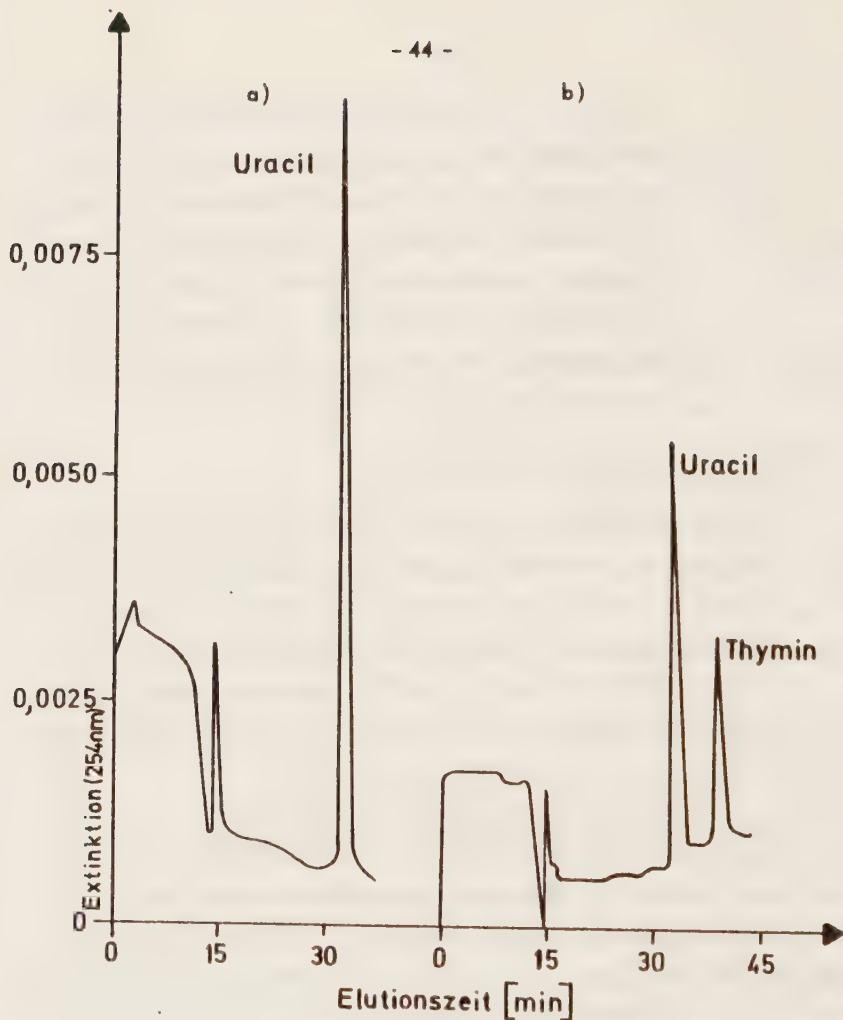


Abbildung 5: Elutionsdiagramme der HPLC-Trennung von Eichlösungen

a: Uracil-Eichlösung (10 μ l), Konzentration: 107,3 pMol/ μ l
 Elutionsmittel: 0,001 M NH_4^+ -Formiatpuffer, pH 4,6

b: Uracil-Eichlösung (5 μ l), Konzentration: 107,3 pMol/ μ l
 Thymin-Eichlösung (5 μ l), Konzentration: 96,8 pMol/ μ l
 Elutionsmittel: 0,01 M NH_4^+ -Formiatpuffer, pH 4,6

(verkleinerte Darstellung 1:2)

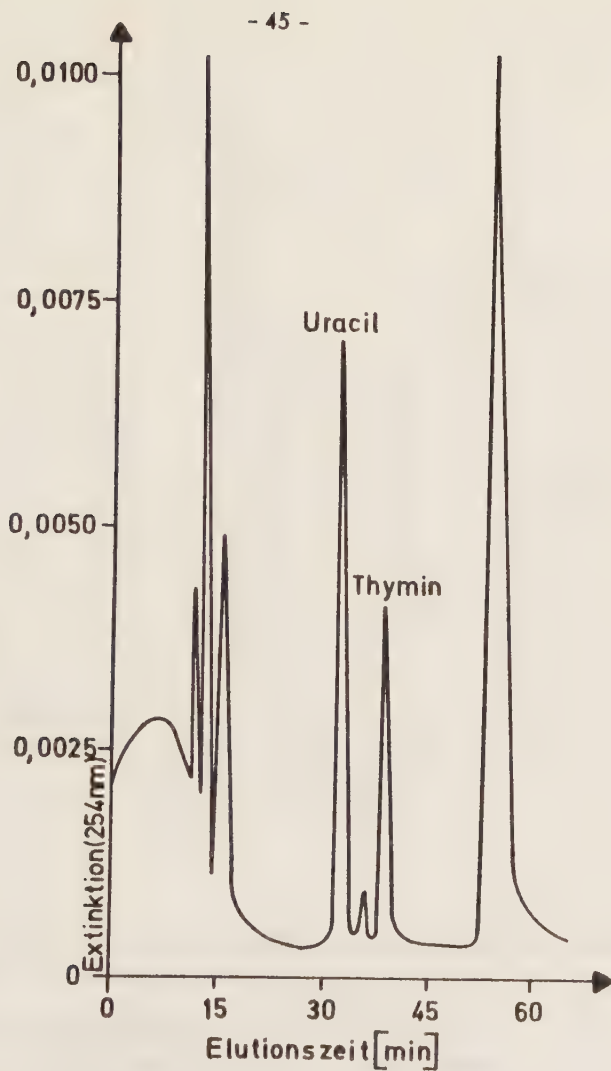


Abbildung 6: Elutionsdiagramm der HPLC-Trennung eines aufgearbeiteten Rattenherzhydrolysats
(Probenvolumen 5 μ l, Elutionsbedingungen siehe Kapitel 4.7.2, der Uracilgipfel entspricht 830 pMol, verkleinerte Darstellung 1:2)

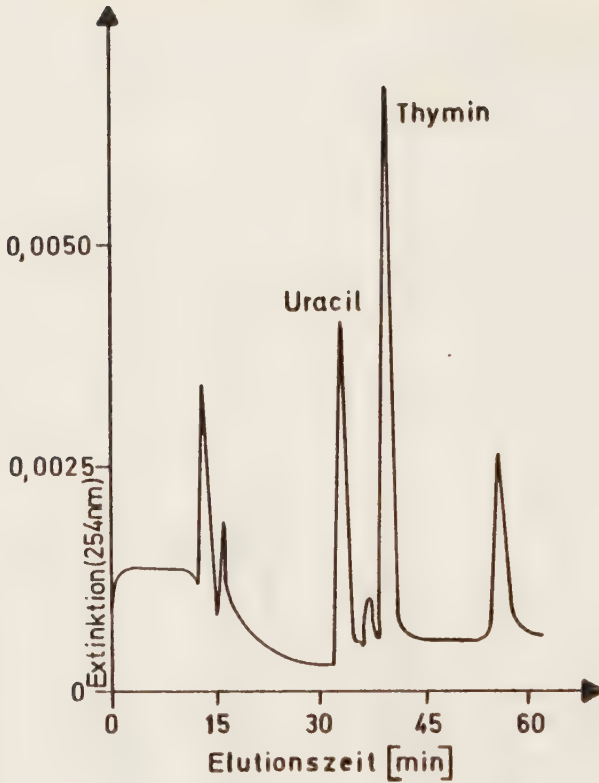


Abbildung 7: Elutionsdiagramm der HPLC-Trennung eines aufgearbeiteten Rattenmilzhydrolysats
(Probenvolumen 1,0 μ l, Elutionsbedingungen siehe Kapitel 4.7.2, der Uracilgipfel entspricht 460 pMol, verkleinerte Darstellung 1:2)

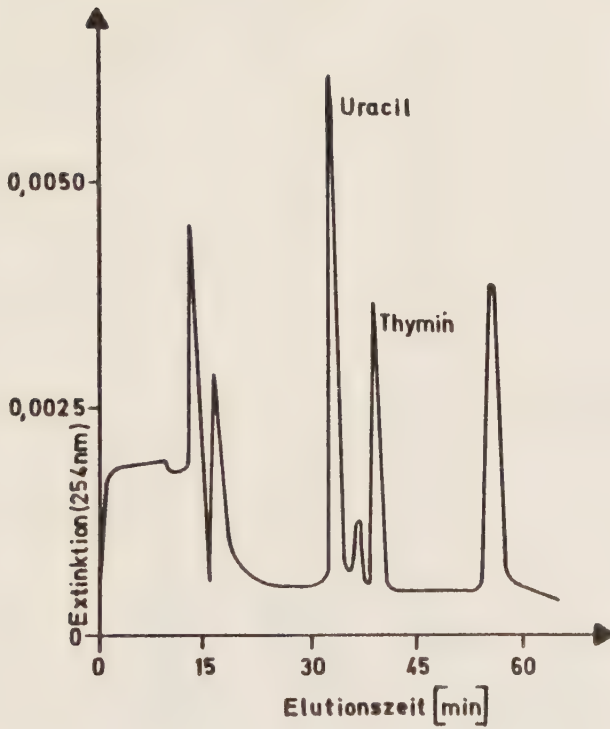


Abbildung 8 : Elutionsdiagramm der HPLC-Trennung eines aufgearbeiteten Rattennierenhydrolysats
(Probenvolumen 2,0 μ l, Elutionsbedingungen siehe Kapitel 4.7.2, der Uracilgipfel entspricht 695 pMol, verkleinerte Darstellung 1:2)

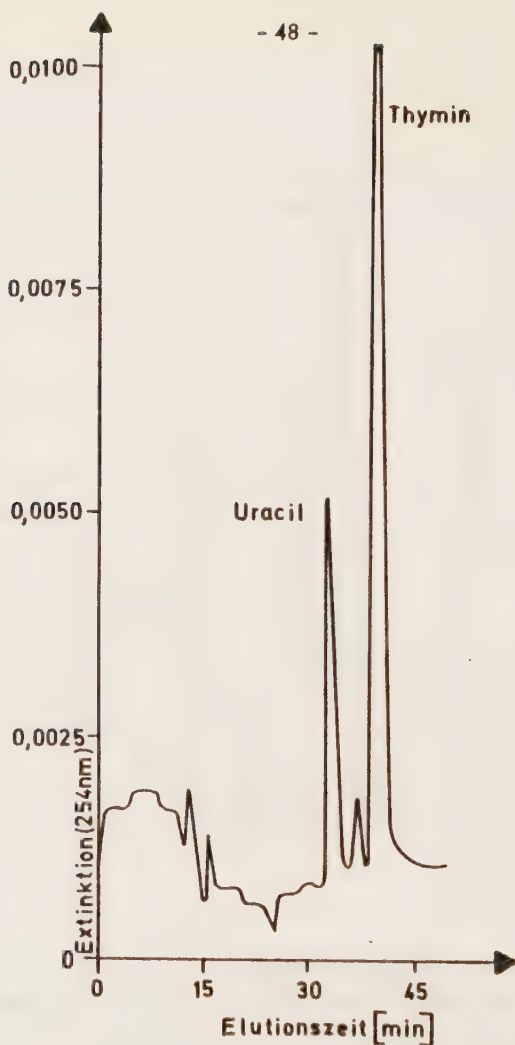


Abbildung 9 : Elutionsdiagramm der HPLC-Trennung eines aufgearbeiteten Rattenthymushydrolysats
(Probenvolumen 1,0 μ l, Elutionsbedingungen siehe Kapitel 4.7.2, der Uracilgipfel entspricht 525 pMol, verkleinerte Darstellung 1:2)

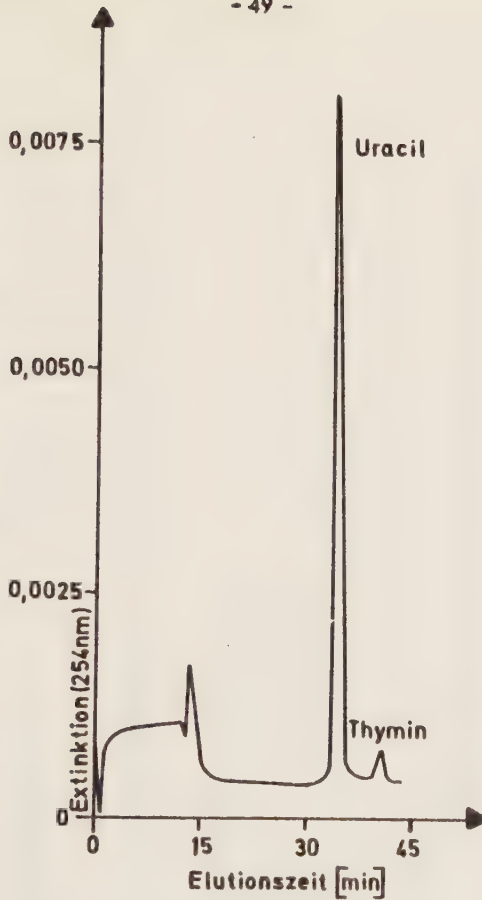


Abbildung 10: Elutionsdiagramm der HPLC-Trennung eines aufgearbeiteten Hefehydrolysats
(Probenvolumen 0,5 μ l, Elutionsbedingungen siehe Kapitel 4.7.2, der Uracilgipfel entspricht 955 pMol, verkleinerte Darstellung 1:2)

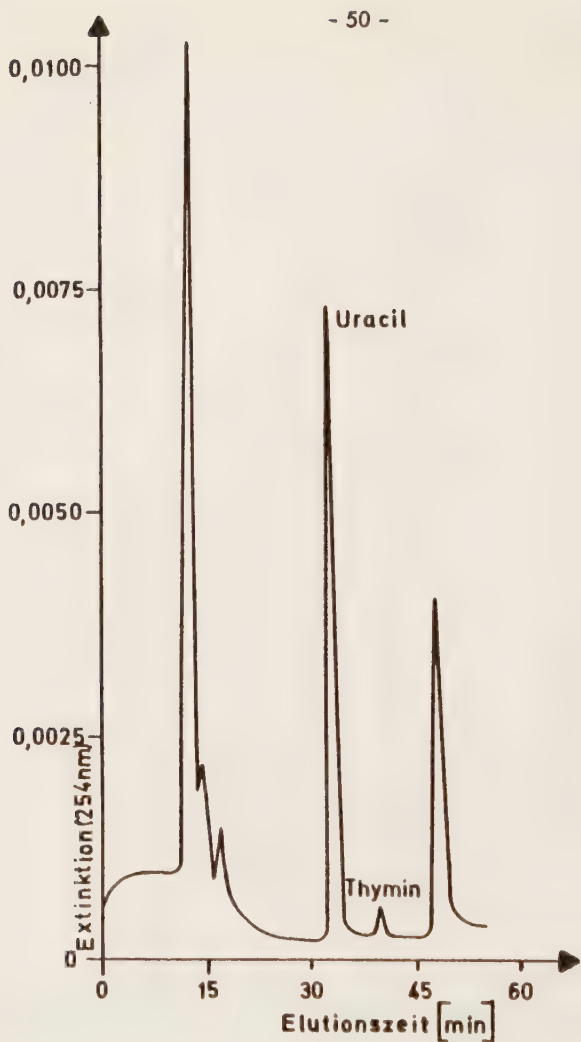


Abbildung 11: Elutionsdiagramm der HPLC-Trennung eines aufgearbeiteten Hydrolysats unbefruchteter Seeigeleier
(Probenvolumen 0,5 μ l, Elutionsbedingungen siehe Kapitel 4.7.2, der Uracilgipfel entspricht 890 pMol, verkleinerte Darstellung 1:2)

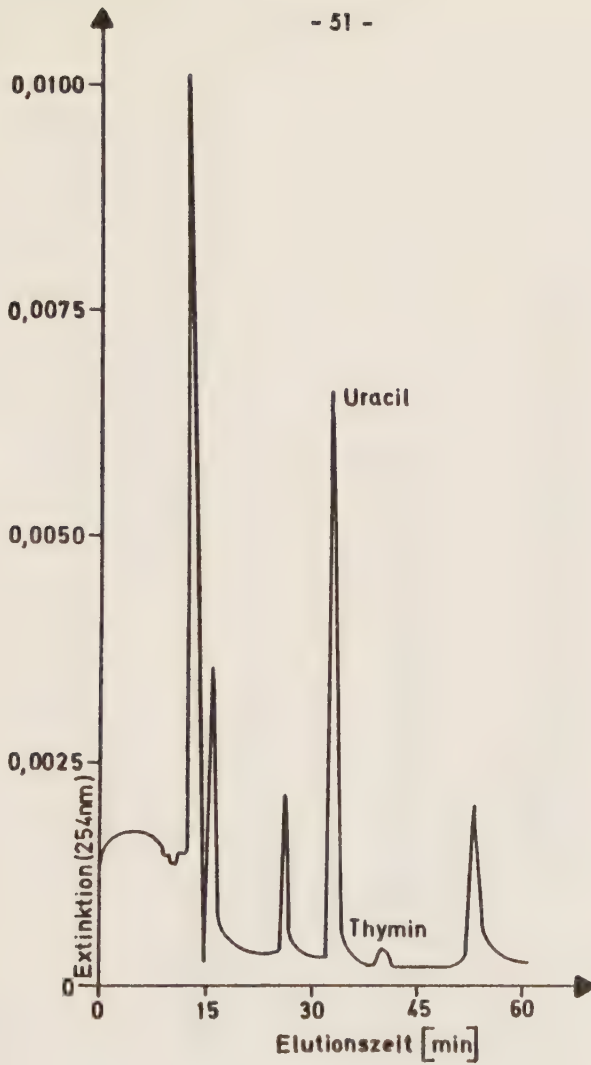


Abbildung 12: Elutionsdiagramm der HPLC-Trennung eines aufgearbeiteten Hydrolysats von Seeigelembryonen (Entwicklungszeit 270 min) (Probenvolumen 2,0 μ l, Elutionsbedingungen siehe Kapitel 4.7.2, der Uracilgipfel entspricht 790 pMol, verkleinerte Darstellung 1:2)

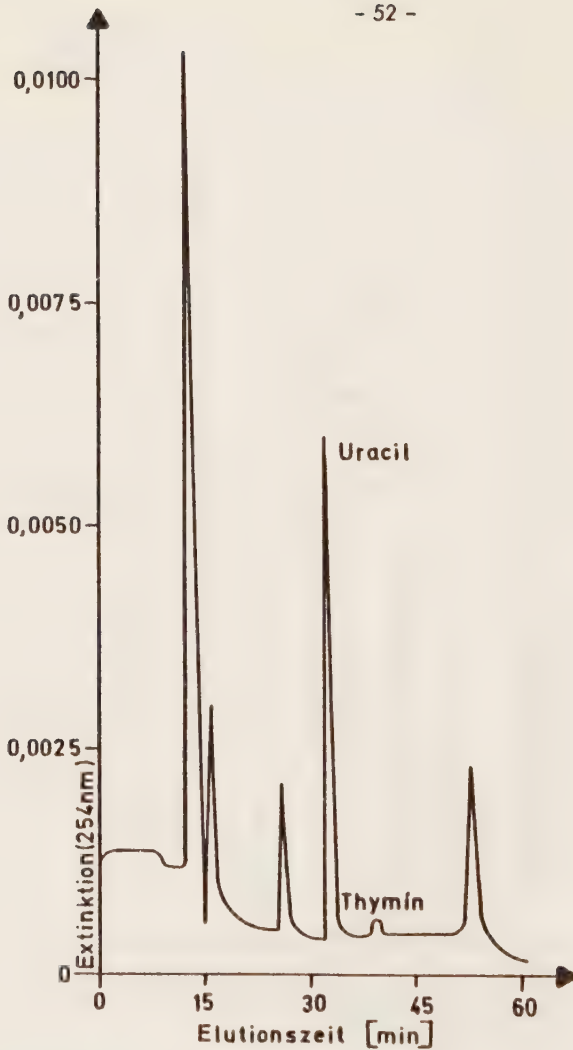


Abbildung 13: Elutionsdiagramm der HPLC-Trennung eines aufgearbeiteten Hydrolysats von Seeigelembryonen (Entwicklungszeit 480 min) (Probenvolumen 2,0 μ l, Elutionsbedingungen siehe Kapitel 4.7.2, der Uracilgipfel entspricht 700 pMol, verkleinerte Darstellung 1:2)

Abbildung 14: Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Uracilgehaltes in unbefruchteten Eiern und sich entwickelnden Embryonen des Seeigels *Sphaerechinus granularis* Lam. (siehe dazu auch Tabelle 3)

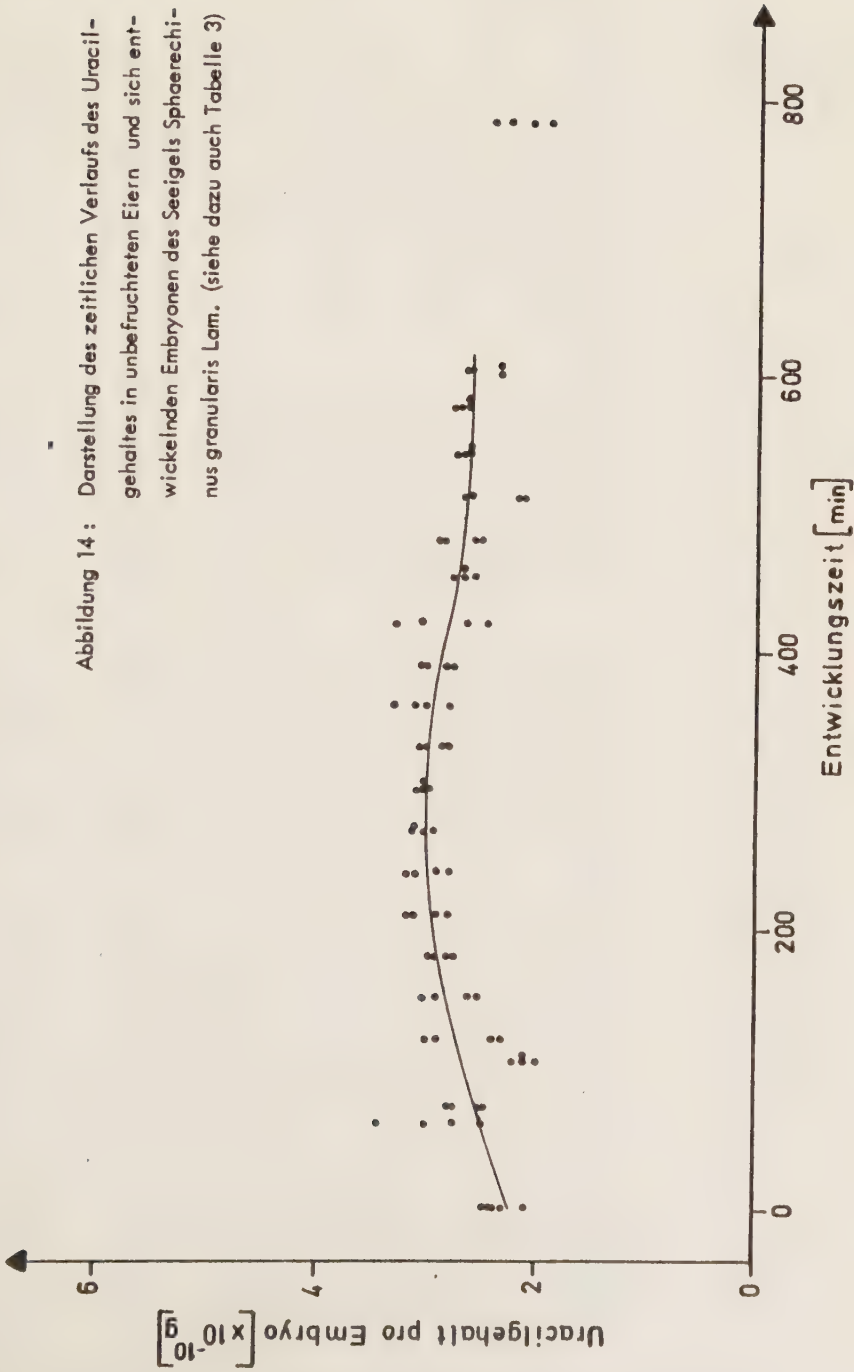


Tabelle 2: Uracil-Gehalte in den Rattengewebs- und Hefelyophilisaten ($\mu\text{g U/mg E}$)
 $(\text{MG}_{\text{Uracil}} = 112)$

Herz

Proben-No.	U _{ges} (pMol)	A (%)	U _{tot} (pMol)	U _{nat} (pMol)	E (mg)	Uracil-Gehalt ($\mu\text{g U/mg E}$)
1	5 390	46,67	11 550	4 050	0,81	0,56
2	37 750	47,37	79 690	72 190	19,25	0,42
3	3 920	41,98	9 340	1 840	0,41	0,50
4	4 540	45,81	9 910	2 410	0,49	0,55
5	4 110	43,27	9 500	2 000	0,44	0,51

Milz

1	6 040	38,19	15 820	8 320	0,77	1,21
2	106 390	38,49	176 410	268 910	20,35	1,48
3	4 290	37,16	11 540	4 040	0,58	0,78 ^a
4	5 390	41,32	13 040	5 540	0,50	1,24
5	5 700	40,25	14 160	6 660	0,56	1,33

Niere

1	6 650	34,88	19 070	11 570	0,80	1,62
2	77 450	39,80	194 600	187 100	20,15	1,04
3	5 650	42,31	13 350	5 850	0,55	1,19
4	5 940	49,47	12 010	4 510	0,42	1,20
5	6 010	47,62	12 620	5 120	0,47	1,22

Thymus

1	7 260	40,24	18 040	10 540	0,66	1,79
2	119 890	35,20	340 600	333 100	19,33	1,93
3	7 690	50,63	15 190	7 690	0,47	1,83
4	6 670	46,78	14 260	6 760	0,40	1,89
5	7 310	51,86	14 100	6 600	0,41	1,80

Hefe

1	14 990	47,25	31 720	24 220	0,67	4,05
2	415 190	48,07	863 720	256 220	20,36	4,71
3	11 270	48,73	23 130	15 630	0,45	3,89
4	12 210	49,08	24 880	17 380	0,46	4,23
5	9 680	41,81	23 150	15 650	0,43	4,08

^a von dieser Probe wurden während der Aufbereitung mehr als Dreiviertel verloren

Tabelle 3: Uracil-Gehalte der Seesigeler- und -embryonen
 $(10^{-10} \text{ g / Ei bzw. Embryo, MG}_{\text{Uracil}} = 112)$

Probe No. RV 22/	U _{ges} (nMol)	I. St.	A (%)	U _{tot} (nMol)	U _{nat} (nMol)	Ei/Emb. zahl (Kap. 3.2.1)	Uracil-Gehalt (10^{-10} g U/Ei bzw. Emb.)
25/2	794	126	45,0	1 764	1 757	944 240	2,08
25/2	895	142	45,0	1 988	1 981	944 240	2,35
25/5	767	142	37,5	2 045	2 038	944 240	2,42
25/5	734	136	37,5	1 957	1 950	944 240	2,31
25/8	121	126	43,1	281	273	101 200	3,01
25/8	136	142	43,1	316	308	101 200	3,41
25/9	72	126	31,9	226	218	100 740	2,42
25/9	81	142	31,9	254	246	100 740	2,74
25/14	45	126	19,5	231	223	102 520	2,44
25/14	51	142	19,5	262	254	102 520	2,78
25/16	99	142	38,6	256	249	101 120	2,77
25/16	88	126	38,6	228	220	101 120	2,44
25/19	84	136	44,1	190	183	98 470	2,08
25/19	88	142	44,1	200	192	98 470	2,18
25/21	84	136	45,2	186	178	100 300	1,99
25/21	88	142	45,2	195	187	100 300	2,09
25/27	84	136	32,2	261	253	100 300	2,83
25/27	88	142	32,2	273	266	100 300	2,97
25/28	65	136	31,6	206	198	99 390	2,23
25/28	68	142	31,6	215	208	99 390	2,34
25/34	76	136	28,4	268	260	101 560	2,87
25/34	80	142	28,4	282	274	101 560	3,02
25/35	106	136	44,9	236	229	102 960	2,49
25/35	111	142	44,9	247	240	102 960	2,61
25/38	99	142	36,8	269	262	100 100	2,93
25/38	95	136	36,8	258	251	100 100	2,80
25/40	114	136	45,0	253	246	98 740	2,79
25/40	119	142	45,0	264	257	98 740	2,91

(Fortsetzung Tabelle 3)

Probe No.	U _{ges} (nMol)	I. St.	A (%)	U _{tot} (nMol)	U _{nat} (nMol)	Ei/Emb. zahl (Kap. 3. 2. 1)	Uracil-Gehalte (10 ⁻¹⁰ g U/Ei bzw. Emb.)
RV 22/							
25/44	114	142	42,7	267	259	100 100	2,90
25/44	109	136	42,7	255	248	100 100	2,77
25/46	102	146	35,9	284	277	98 740	3,14
25/46	99	142	35,9	276	268	98 740	3,04
25/49	96	146	34,3	280	272	96 970	3,15
25/49	94	142	34,3	274	267	96 970	3,08
25/50	93	146	35,8	260	252	99 220	2,85
25/50	91	142	35,8	254	247	99 220	2,78
25/55	83	146	31,0	268	260	96 970	3,01
25/55	81	142	31,0	261	254	96 970	2,93
25/58	120	146	42,7	281	274	97 870	3,13
25/58	117	142	42,7	274	267	97 870	3,05
25/61	50	146	17,9	279	272	100 410	3,03
25/61	48	142	17,9	268	261	100 410	2,91
25/62	97	142	34,5	281	274	102 740	2,98
25/62	99	146	34,5	287	279	102 740	3,05
25/68	61	142	22,9	266	259	102 740	2,82
25/68	66	153	22,9	288	281	102 740	3,06
25/69	85	142	32,5	262	254	102 740	2,77
25/69	92	153	32,5	283	276	102 740	3,00
25/73	104	153	34,5	301	294	99 120	3,32
25/73	97	142	34,5	281	274	99 120	3,09
25/75	105	142	41,0	256	249	100 960	2,76
25/75	113	153	41,0	276	268	100 960	2,97
25/79	101	153	36,8	274	267	99 120	3,02
25/79	94	142	36,8	255	248	99 120	2,80
25/80	92	142	36,1	255	247	101 420	2,73
25/80	99	153	36,1	274	267	101 420	2,95
25/86	116	153	46,6	249	241	102 740	2,63
25/86	108	142	46,6	232	224	102 740	2,44
25/88	80	142	28,1	285	277	101 340	3,06
25/88	86	153	28,1	306	299	101 340	3,30

Probe No. RV 22/	U _{ges} (nMol)	I.St.	A (%)	U _{tot} (nMol)	U _{nat} (nMol)	Ei/Emb. zahl (Kap.3.2.1)	Uracil-Gehalt (10 ⁻¹⁰ g U/Ei bzw. Emb.)
25/92	86	153	33,1	260	252	102 740	2,75
25/92	80	142	33,1	242	234	102 740	2,55
25/93	87	141	35,2	247	240	102 270	2,62
25/93	88	142	35,2	250	243	102 270	2,66
25/99	78	141	33,5	233	225	99 860	2,53
25/99	78	142	33,5	233	225	99 860	2,53
25/101	72	141	27,4	263	255	100 320	2,85
25/101	72	142	27,4	263	255	100 320	2,85
25/103	79	141	33,2	238	230	98 040	2,63
25/103	80	142	33,2	241	233	98 040	2,67
25/104	59	141	29,9	197	190	100 320	2,12
25/104	60	142	29,9	201	193	100 320	2,16
25/110	82	141	33,2	247	239	99 880	2,69
25/110	82	142	33,2	247	239	99 880	2,69
25/113	67	142	27,8	241	234	99 880	2,62
25/113	66	141	27,8	237	230	99 880	2,58
25/118	87	141	35,7	244	236	98 520	2,69
25/118	88	142	35,7	246	239	98 520	2,72
25/120	79	141	31,8	248	241	102 150	2,64
25/120	80	142	31,8	252	244	102 150	2,68
25/122	70	142	32,0	219	211	99 880	2,37
25/122	69	141	32,0	216	208	99 880	2,33
25/123	82	141	34,5	238	230	99 430	2,59
25/123	82	142	34,5	238	230	99 430	2,59
25/129	85	142	41,7	204	196	99 430	2,21
25/129	85	141	41,7	204	196	99 430	2,21
25/132	55	152	28,5	193	185	102 150	2,03
25/132	51	142	28,5	179	171	102 150	1,88

Tabelle 4 : Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (s) und der Wert der Standardabweichung in Prozent des Mittelwertes (%) für die in den Rattengewebs- und Hefelyophilisaten ermittelten Uracil- und RNA-Konzentrationen (der Uracilgehalt von RNA wurde zu 9 % angenommen, die Angabe der Werte erfolgte als μg Uracil pro mg Lyophilisat bzw. als μg RNA pro mg Lyophilisat)

		Uracil	RNA
Herz	$\bar{x}$	0.51	5.70
	s	0.056	0.62
	%	10.9	10.9
Milz	$\bar{x}$	1.32 ^a	14.7
	s	0.121	1.34
	%	9.1	9.1
Niere	$\bar{x}$	1.25	13.9
	s	0.217	2.41
	%	17.3	17.3
Thymus	$\bar{x}$	1.85	20.6
	s	0.060	0.67
	%	3.2	3.2
Hefe	$\bar{x}$	4.19	46.6
	s	0.314	3.49
	%	7.5	7.5

^a Mittelwert für nur 4 der 5 Uracilbestimmungen

4.9 Uracil-Gehalte der Seeigeleier und -embryonen

Es wurde zur Bestimmung verfahren wie in Kapitel 4.8 für die Lyophilisate geschildert. Die erhaltenen Diagramme sind in den Abbildungen 11 bis 13 dargestellt. Im letzten Schritt der Bestimmung wurde jedoch nicht auf mg Einwage, sondern auf den Uracil-Gehalt pro unbefruchtetes Ei bzw. pro Embryo jeder Entwicklungsstufe umgerechnet (10^{-10} g U/Ei bzw. Embryo in Tabelle 3). Der zeitliche Verlauf des RNA-Gehaltes der Seeigeleier und der -embryonen während der ersten 760 min ihrer Entwicklung ist in Abbildung 14 dargestellt.

4.10 Fehlerrechnung

Die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Uracilkonzentrationen in den Rattengewebes- und Hefelyophilisaten wurden aus jeweils 5 Werten (siehe Tabelle 2) ermittelt. Als Rechner diente eine Olivetti-Divisumma. Die dabei erhaltenen Werte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

5. Diskussion

Im Rahmen der Entwicklung routinemäßig anwendbarer Verfahren zur Erfassung des DNA- und RNA-Gehaltes von Geweben und Zellkulturen unterschiedlicher Herkunft sollte in Ergänzung zu den von F.D. Gauchel et al. (21, 22) und G. Gauchel et al. (23) entwickelten gas- und flüssigchromatographischen Methoden zur Bestimmung des Thymins als DNA-Leitbase ein weiteres Verfahren ausgearbeitet werden, das die quantitative Erfassung des Uracils als RNA-Leitbase gestattet.

Zur Freisetzung des Uracils aus den freien Nukleotiden (UMP, UDP, UTP) und den Polynukleotiden (RNA) wurde in Anlehnung an eine von Solomon (73, 74) entwickelte Uracilbestimmungsmethode 70 %ige Perchlorsäure verwendet. Im Gegensatz zu einer von Jervell et al. (35) beschriebenen Methode, bei der nach der Gewebshydrolyse in Ameisensäure sowohl freies Uracil als auch Uridin im Hydrolysat enthalten sind, wird beim Aufschluß von Gewebeproben in konzentrierter Perchlorsäure nur freies Uracil erhalten.

Die Stabilität der N-glycosidischen Bindung zwischen Uracil und Ribose scheint insbesondere vom Proteingehalt des Untersuchungsmaterials beeinflußt zu werden, und zwar schützen steigende Proteinkonzentrationen die N-glycosidische Bindung in zunehmendem Maße vor der Hydrolyse (35).

Da mit dem vorliegenden Verfahren bei routinemäßigem Einsatz häufig wechselndes Untersuchungsgut aufgeschlossen werden muß, konnte nur durch Verwendung von 70 %iger Perchlorsäure eine in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Probe wechselnde Hydrolyse-rate der N-glycosidischen Bindung vermieden werden. Für die geringen Mengen lyophilisierten Gewebes (jeweils 0,5 bis 1,0 mg,

mitunter aber auch Mengen bis zu 20 mg) erwiesen sich 0,5 bis 1,0 ml 70 %iger Perchlorsäure zur Hydrolyse als ausreichend.

Dieses Vorgehen unterscheidet sich somit wesentlich von den gebräuchlichen Hydrolysemethoden, die zur Spaltung N-glycosidischer Bindungen zwischen Nukleinsäurebasen und Desoxyribose eingesetzt werden. Da die N-glycosidischen Bindungen in Desoxyribosiden und Desoxyribotiden insbesondere bei den Purin-haltigen Substanzen gegenüber konzentrierten Säuren wesentlich instabiler sind und rasch hydrolysieren (75) im Vergleich zu den Ribosiden und Ribotiden, wird hauptsächlich die flüchtige Ameisensäure zur Hydrolyse verwendet.

Denn der große Nachteil der Perchlorsäure gegenüber der Ameisensäure liegt für die präparative Mikroanalyse darin, daß Perchlorsäure nicht flüchtig ist und sich somit nicht durch Anlegen eines Unterdrucks an der Wasserstrahlpumpe im Exsikkator abdampfen läßt. Vielmehr muß die Perchlorsäure stets als schwer lösliches Kaliumperchlorat durch Zugabe hochkonzentrierter (in der Regel 7 N KOH) ausgefällt werden.

Dabei wird nach der Zentrifugation der Probe meist ein alkalischer Überstand als Analysenlösung erhalten. Die Neutralisierung wird durch Zugabe eines hochmolaren Puffers erreicht, was allerdings die Ionenstärke der Lösung stark erhöht. Bei nachfolgender Einengung des Volumens werden dann häufig die Löslichkeitsprodukte der enthaltenen Salze überschritten, und die betreffenden Substanzen fallen amorph oder kristallin aus. Dabei besteht dann die Gefahr, daß - ebenso wie bei der vorausgehenden Ausfällung der Perchlorsäure als Kaliumsalz - ein bestimmter Prozentsatz des zu bestimmenden Materials an die Kristalle adsorbiert und nach deren Abtrennung der Bestimmung entzogen wird, was eine mitunter erhebliche Erniedrigung der Ausbeuten bewirkt.

Da grundsätzlich bei jedem Analysenschritt mit dem Verlust eines geringen Anteils der zu bestimmenden Substanz gerechnet werden muß, ist erstmals von Solomon (73, 74) ein Verfahren in die biochemische Analytik eingeführt worden, das die genaue Berechnung der Ausbeute eines Reinigungsschrittes erlaubt, die Isotopenverdünnungsanalyse (siehe auch Kapitel 3.1). Das Verfahren wurde auch in der hier vorgelegten Arbeit angewendet. Als Tracer wurde radioaktiv markiertes $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Uracil verwendet.

Tritiierte Substanzen, wie etwa ^3H -Uracil, können bei Verfahren, die Hydrolyseschritte mit konzentrierten Säuren enthalten, nicht herangezogen werden, da mit Sicherheit dabei ein Teil der Tritiumatome gegen die Protonen der Säure ausgetauscht werden. Nach Eliminierung der Säure führt dies dann zur Berechnung zu niedriger Ausbeuten auf Grund zu hoher scheinbarer Verluste.

Die in dieser Arbeit mit dem entwickelten Verfahren erzielten Ausbeuten liegen zwischen 17,8 und 51,9 %. Dabei sind die bei der Analyse der Rattengewebe und der Hefe erzielten Werte mit Mittelwerten von 43,0 und 47,0 % deutlich höher als die mittlere Ausbeute bei Seeigeleiern und -embryonen mit 34,9 %. Dieses Verhalten scheint jedoch nicht mit den im Ausgangsmaterial enthaltenen absoluten RNA-Mengen korreliert. Denn wie in Tabelle 2 und 3 dargestellt, enthielten die Hefeproben bezogen auf das Trockengewicht erwartungsgemäß die höchsten relativen RNA-Konzentrationen, dicht gefolgt von den Seeigeleiern und -embryonen, während die Rattengewebe nur etwa die Hälfte bis ein Viertel der RNA-Mengen enthielten.

Die geringen Ausbeuten, die bei der Aufarbeitung der Seeigeleier und -embryonen erzielt wurden, müssen wohl auf den relativ großen Salzgehalt der aus Meerwasserinkubaten abzentrifugierten Proben und auf große Mengen schwer hydrolysierbarer Zellbestand-

teile der Organismen (57) zurückgeführt werden. Die generell niedrigen Ausbeuten von nur 35 bis 47 % beruhen sicher auch auf zwei weiteren Ursachen :

1. Nach Zentrifugationen wurden die Überstände der Proben jeweils sehr großzügig abgezogen, um keine sedimentierten Bestandteile in den als Analysenlösung weiterverwendeten Überstand zu verschleppen.
2. Nach der Vorreinigung der Hydrolysate an Anionenaustauscherstulen wurden nur solche Fraktionen des Eluats zur weiteren Aufbereitung miteinander vereinigt, die in 50 µl Lösung mindestens 500 cpm Radioaktivität enthielten. So wurde das Volumen der Analysenlösung möglichst gering gehalten. Allerdings wurden so häufig Fraktionen verworfen, die noch relativ hohe Anteile an Radioaktivität enthielten.

Mit dem verwendeten Flüssigszintillationszähler lassen sich auch geringe Radioaktivitätsmengen sehr präzise erfassen. Die Genauigkeit der Messung einer bestimmten Radioaktivitätsmenge, die nur etwa 30 bis 50 % der einer Vergleichsprobe entspricht, ist im Bereich zwischen 2000 und 4000 cpm, wie er hier meist erfaßt wurde, besser als 2,5 %. Daher kann auch die Ausbeute eines Analysenschrittes ohne weiteres einmal den Wert von 50 bis 60 % unterschreiten.

F.D.Gauchel et al. (21, 22) und G.Gauchel et al. (23) verwendeten zur Aufbereitung der Hydrolysate zur Bestimmung des Thymins als Leitbase der DNA noch einen gesonderten Sublimationsschritt, der aus dem trocknen Hydrolysatrückstand die Hauptmenge der zu bestimmenden Base abtrennen sollte. Gleichzeitig konnte dieser Schritt eine erhebliche Abreicherung von UV-absorbierenden Begleitsubstanzen erzielen, so daß er zunächst auch noch von Müller et al. (57) bei der Bestimmung des DNA-Gehaltes in Seeigeleiern und -embryonen durchgeführt wurde.

Allerdings erwies sich das Sublimationsverfahren im Routinebetrieb als zu anfällig gegenüber Störungen. So muß z.B. stets auf gute Dichtigkeit des evakuierten Systems geachtet werden, die für den Sublimationsvorgang notwendige Temperatur von 175°C muß äußerst genau eingehalten werden, und der häufige Glasbruch der präzise gearbeiteten Sublimationskolben und -finger stellt sowohl in zeitlicher als auch finanzieller Hinsicht eine nicht unerhebliche Belastung dar, ganz abgesehen von dem dabei oft unvermeidlichen Verlust teilweise nicht wieder zu beschaffenden Untersuchungsgutes einer Versuchsserie. Die Verwendung eines Ölbades in Verbindung mit einer wassergekühlten Apparatur stellt außerdem im Falle eines Glasbruchs ein nicht unerhebliches Verletzungsrisiko dar.

Auf Grund des letzten Sachverhaltes wurde die von Gauchel et al. (21) beschriebene Sublimationsapparatur zunächst mit Polyäthylenglycol als Heizphase betrieben, dann jedoch durch die routinemäßig auch von nur wenig erfahremem Hilfspersonal einfacher zu bedienende Säulenchromatographie der Analysenlösung an Anionenaustauschern ersetzt. Eine dadurch bedingte Senkung der Ausbeuten um etwa 35 % wurde dabei bewußt in Kauf genommen.

Neben der Genauigkeit der Radioaktivitätsbestimmung ist auch die Empfindlichkeit des nachfolgend für die Bestimmung der Uracilbase verwendeten Systems ausschlaggebend, insbesondere im Hinblick auf die relativ geringen Ausbeuten des Chromatographieschrittes an Anionenaustauschern. Wird nämlich zu viel von der zu bestimmenden Substanz während des Analysengangs verloren, leidet zwangsläufig auch bei großer Empfindlichkeit des Bestimmungssystems die Präzision der quantitativen Analysen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die quantitative Bestimmung des Uracils durch Peakflächenintegration der in einem HPLC-System von den Begleitsubstanzen abgetrennten RNA-Leitbase. Dabei hängt die Empfindlichkeit des Systems in entscheidendem Maße ab von der klein-

sten, noch mit geringer Standardabweichung erfaßbaren Uracilmenge und von dem größtmöglichen Volumen an Analysenlösung, das ohne Beeinträchtigung der Auflösung der Trennung auf die HPLC-Säule aufgegeben werden kann.

Das zur Bestimmung verwendete HPLC-System erwies sich entsprechend den genannten Anforderungen als ausreichend empfindlich und belastbar. In der Regel reichten 20 µl Analysenlösung für eine quantitative Analyse aus. Das entsprach im Mittel weniger als 10 % des zur chromatographischen Analyse aufbereiteten Volumens. Dies ermöglichte Mehrfachbestimmungen, die allgemein für die Ermittlung präziser Analysenwerte unverzichtbar sind.

Zur einwandfreien quantitativen Bestimmung von Substanzmengen aus einem Chromatogramm ist die vollständige Abtrennung der betreffenden Substanz dann notwendig, wenn keine Rechner-Integratoren mit vorgegebenem Programm zur Peakauswertung des Chromatogramms zur Verfügung stehen. Da im vorliegenden Falle nur ein einfacher Proportionalzähler für Flächenwerte verfügbar war, mußte zunächst die vollständige Abtrennung des Uracils aus den begleitenden, zum größten Teil unbekannten, UV-absorbierenden Substanzen entwickelt werden.

Dazu wurden Säulentemperatur, Säulenlänge, Puffermolarität und Durchflußgeschwindigkeit jeweils als Einzelparameter variiert. Da das Uracil zwischen pH 1 und pH 7 keine Änderung seiner Ladung erfährt, was die Retentionszeit beeinflussen könnte, wurde bei pH 4,6 gearbeitet, wie dies bereits von Gauchel et al. (23) für die Darstellung des Thymins im HPLC-System beschrieben wurde.

Auffällig war, daß lediglich die Puffermolarität einen verwertbaren Einfluß auf die relativen Retentionszeiten der Begleitsubstanzen ausübte und damit als Einzelparameter bereits eine vollständige Reinigung des Uracils erlaubte.

Bei Konzentrationen des Ammoniumformiat-Puffers unter 0,01 M wurden die meisten UV-absorbierenden Substanzen auf dem Austauscher retiniert, während Uracil und auch Thymin stets mit gleichen, gut reproduzierbaren Retentionszeiten von der Säule eluiert wurden (Abb. 5-13). Daher wurde ein 0,01 M Ammoniumformiat-Puffer, pH 4,6, als Elutionsmittel gewählt.

Als Trennsystem diente eine 300 cm Säule mit einem Innendurchmesser von 0,18 cm, die bei einer Trenntemperatur von 80°C mit einer Geschwindigkeit von $9.8 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ durchströmt wurde. Der Druckabfall in der Säule konnte dabei unter dem durch die technischen Daten der verwendeten Kolbenmembranpumpe gesetzten Maximaldruck von 350 bar gehalten werden.

Die mit der vorliegenden Methode gewonnenen Daten über den Uracilgehalt verschiedener Rattengewebe und der Hefe stimmen gut mit den wenigen in der Literatur publizierten Werten überein. Dabei wurde für die Umrechnungen von Uracil- in RNA-Konzentrationen ein Uracilgehalt der RNA von 9 % zu Grunde gelegt.

So finden sich bei Bielka (5) Werte von 40 μg RNA pro mg Hefelyophilisat. Dies entspricht recht genau dem mit der vorliegenden Methode ermittelten Wert von 46,5 μg RNA pro mg Lyophilisat. Auch der Wert von 5,6 μg RNA pro mg Lyophilisat für Herzmuskulatur entspricht größenordnungsmäßig dem bei Bielka (5) allerdings für Skelettmuskulatur der Ratte angegebenen Wert von 3,5 μg RNA pro mg Lyophilisat.

Es erscheint wichtig, in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, daß die RNA-Konzentrationen in organischem Material ebenso wie z.B. die Proteingehalte stets dem Einfluß vieler Faktoren unterworfen sind, wie Alter und Ernährungszustand des jeweiligen Versuchstieres oder unterschiedlichen Wachstumsphasen untersuchter Zellpopulationen, so daß die Zusammensetzung eines Gewebes starken Schwankungen unterworfen ist.

So wird bei Bielka (5) der RNA-Gehalt der Rattenniere mit $34.5 \mu\text{g}$ pro mg Lyophilisat angegeben, während in den hier untersuchten Proben nur $13.9 \mu\text{g}$ RNA pro mg Lyophilisat nachgewiesen werden konnten.

Für die RNA-Gehalte in Rattenmilz ($14.9 \mu\text{g}$ pro mg) und Rattenthymus ($20.6 \mu\text{g}$ pro mg) konnten in der Literatur keine Vergleichsangaben nachgewiesen werden.

Recht bemerkenswert ist das Ergebnis der Untersuchungen über den RNA-Gehalt von Seeigeleiern und -embryonen im Hinblick auf bereits vorliegende Untersuchungen über den DNA-Gehalt dieses Materials. Die Bestimmungen wurden in Proben durchgeführt, die während der ersten 780 min der Entwicklung des befruchteten Eies des Seeigels *Sphaerechinus granularis* Lam. und von unbefruchteten Eispensionen gewonnen wurden. Die Werte für den RNA-Gehalt bewegen sich dabei etwa zwischen 2,1 und 3,8 ng RNA pro unbefruchtetem Ei bzw. pro Embryo, mit einem deutlichen Gipfel bei einer Entwicklungszeit von 250 min (Abb. 14).

Vergleicht man den Verlauf der aus den ermittelten RNA-Konzentrationen über die Zeit resultierenden Kurve mit den in früheren Arbeiten von Müller et al. (56, 57) erhaltenen Werten für den DNA-Gehalt von Seeigeleiern und -embryonen gleicher Herkunft, so ergibt sich eine auffällige Parallelität, da auch die DNA-Konzentration im unbefruchteten Ei bzw. in den Embryonen im Verlaufe der ersten Stunden stark zunimmt mit einem deutlichen Gipfel bei etwa 250 bis 300 min. Es handelt sich dabei um eine Zunahme der cytoplasmatischen DNA-Konzentration, die nach den hier vorliegenden Daten mit einer gleichgerichteten Änderung der RNA-Konzentration verbunden ist.

Wenn auch die hier vorgelegten Werte für den RNA-Gehalt verschiedener Gewebe und Zellen recht gut mit in der Literatur berichteten Werten übereinstimmen und die aus Seeigeleiern und -embryonen gewonnenen Daten sich in ein bereits beschriebenes System in ihrem Verhalten sinnvoll einfügen, so müssen dennoch die relativ hohen

Standardabweichungen der für die Rattengewebe und die Hefe gewonnenen Werte für die RNA-Konzentrationen beachtet werden, die sich auch bei häufiger Wiederholung der Analysen mit dem gleichen Untersuchungsmaterial insbesondere für die Rattengewebe finden (9).

Für die Seeigeleier und -embryonen konnten keine derart aussagekräftigen Werte ermittelt werden, da nur eine begrenzte Zahl von Proben zur Verfügung stand. Für die jeweils zwei Bestimmungen eines jeden Entwicklungsstadiums finden sich jedoch bei eingehender Betrachtung nur wenige Werte, die um mehr als 10 % voneinander differieren.

Bei der Vielzahl der durchgeführten RNA-Bestimmungen darf aus der Gesamtheit der Ergebnisse gefolgert werden, daß die hier vorgestellte Methode zur Erfassung des RNA-Gehaltes mit Hilfe der Uracilbestimmung in biologischem Material den Anforderungen voll gerecht wird, die hinsichtlich der Präzision an ein solches Verfahren gestellt werden müssen.

6. Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren beschrieben, das routinemäßig die Erfassung des RNA-Gehaltes von Geweben und Kulturzellen unterschiedlicher Herkunft ermöglicht. Dazu wird der Gesamturacilgehalt eines 0.5 bis 20 mg umfassenden Gewebs- bzw. Zellyophilisats quantitativ ermittelt. Zur Berechnung der RNA-Menge wird ein Uracilgehalt der RNA von 9 % zu Grunde gelegt.

Zur Freisetzung des Uracils aus seiner N-glycosidischen Bindung in freien Nukleotiden (UMP, UDP, UTP) und in Polynukleotiden (RNA) dient eine Hydrolyse des Untersuchungsmaterials in 70 %iger Perchlorsäure für 60 min bei 100°C.

Durch eine Vorreinigung der Hydrolysate an Dowex 1X8-Anionenaustauscherstulen werden wesentliche Anteile störender, UV-absorbierender Substanzen abgetrennt.

Zur quantitativen Erfassung des Uracils in den Proben dient eine Auftrennung der in der Analysenlösung enthaltenen UV-absorbierenden Substanzen auf Kationenaustauscherstulen in einem Hochdruckflüssigchromatographischen (HPLC) System. Die Ermittlung des Uracilgehaltes einer aufgetrennten Probe erfolgt dann durch Peakflächenintegration des Uracilgipfels im Chromatogramm und anschließenden Vergleich des dabei erhaltenen Wertes mit dem einer Uracil-Eichlösung.

Das HPLC-System besteht aus einer 0.18 x 300 cm Säule aus rostfreiem Stahl, die bei einer Trenntemperatur von 80°C von einem 0.01 M Ammoniumformiat-Puffer, pH 4.6, durchströmt wird. Der durch die technischen Daten der verwendeten Kolbenmembranpumpe vorgegebene Maximaldruck von 350 bar wird dabei bei einer Durchflußgeschwindigkeit von $9.8 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ nicht überschritten. Unter

den vorgenannten Bedingungen kann eine Analyse durch berechnete Serienschaltung der Chromatogramme innerhalb von 45 min abgeschlossen werden.

Die Verwendung eines 0.01 M Ammoniumformiat-Puffers, pH 4.6, ermöglicht die vollständige Abtrennung des Uracils von den begleitenden, zum größten Teil unbekannten, UV-absorbierenden Substanzen, da unter den gewählten Bedingungen die Verunreinigungen zum Überwiegenden Teil auf der Säule retiniert werden.

Die Berechnung der Ausbeuten erfolgt mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung von 2-¹⁴C-markiertem Uracil. Die Ausbeuten liegen für die als Referenzsubstanzen gewählten Rattengewebe Herz, Milz, Niere und Thymus, sowie für die ebenfalls in die Untersuchung einbezogene Hefe zwischen 43 und 47 %. Allerdings finden sich für Seeigeleier und -embryonen mit 35 % Ausbeute niedrigere Werte.

Die generell etwas niedrigen Ausbeuten sind auf eine großzügige Trennung von Überstand und Niederschlag bei Reinigungsschritten in Zentrifugen zurückzuführen. Auch die Vorreinigung der Analysenlösungen an Anionenaustauscherstülen erniedrigt die Ausbeuten, da möglichst geringe Volumina zur Weiterverarbeitung zurückbehalten werden.

Die Werte für den RNA-Gehalt der Rattengewebe und der Hefe stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Werten recht gut überein.

Die Werte für den RNA-Gehalt untersuchter Seeigeleier und -embryonen fügen sich sinnvoll in früher beschriebene Systeme ein. Sie zeigen, daß auch der RNA-Gehalt sich entwickelnder Seeigelembryonen im wesentlichen dem der cytoplasmatischen DNA in frühen Entwicklungsstadien folgt.

Obwohl die Standardabweichungen vom Mittelwert bei einigen der untersuchten Gewebe relativ hoch sind, darf die hier vorgestellte Methode zur Erfassung des RNA-Gehaltes in biologischem Material über die RNA-Leitbase Uracil als durchaus wertvolle Ergänzung bereits bestehender Verfahren zur Ermittlung des DNA-Gehaltes in biologischem Material angesehen werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Allen, R. J. L. The Estimation of Phosphorus
Biochemical Journal 34 , 858 - 865 (1940)
2. Ascoli, A. Ueber ein neues Spaltungsproduct des Hefenucleins
Zeitschrift für Physiologische Chemie 31 , 161 - 164 (1900)
3. Astbury, W. T. and Bell, F. O. X-Ray Study of Thymonucleic Acid
Nature 141 , 747 - 748 (1938)
4. Behrens, M. Über die Lokalisation der Hefenukleinsäure in
pflanzlichen Zellen
Zeitschrift für Physiologische Chemie 253 , 185 - 192 (1938)
5. Bielka, H. "Nukleinsäuren" , in: Bielka, H. (Hrsgbr) "Molekulare
Biologie der Zelle" , Seite 58 , Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart
(1969)
6. Boarland, M. P. V. and McOmie, J. F. W.
Pyrimidines. Part II. The Ultra-violet Absorption Spectra of Some
Monosubstituted Pyrimidines
The Journal of the Chemical Society , p. 3716 - 3722 (1952)
7. Brachet, J. Remarques sur la formation de l'acide thymonucléique
pendant le développement des oeufs à synthèse partielle
Archives de Biologie, Liege 48 , 529 - 548 (1937)
8. Bray, G. A. A Simple Efficient Liquid Scintillator for Counting
Aqueous Solutions in a Liquid Scintillation Counter
Analytical Biochemistry 1 , 279 - 285 (1960)
9. Breter, H. J. Persönliche Mitteilung

10. Brown, D.J. and Short, L.N.
Simple Pyrimidines. Part I. Spectroscopic Studies
The Journal of the Chemical Society p. 331 - 337 (1953)
11. Burtis, C.A. and Warren, K.S.
Identification of Urinary Constituents Isolated by Anion-Exchange
Chromatography
Clinical Chemistry 14, 290 - 301 (1968)
12. Caspersson, T. Studien über den Eiweißumsatz der Zelle
Naturwissenschaften 29, 33 - 43 (1941)
13. Cavaliere, L.F., Bendich, A., Tinker, J.F., and Brown, G.B.
Ultraviolet Absorption Spectra of Purines, Pyrimidines and Triazolo-
pyrimidines
The Journal of the American Chemical Society 70, 3875 - 3880 (1948)
14. Chargaff, E. and Zamenhof, S. The Isolation of Highly Poly-
merized Desoxypentosenucleic Acid from Yeast Cells
The Journal of Biological Chemistry 173, 327 - 335 (1948)
15. Chargaff, E. Chemical Specificity of Nucleic Acids and
Mechanism of their Enzymatic Degradation
Experientia 6, 201 - 240 (1950)
16. Chargaff, E., Lipshitz, R., Green, C., and Hodes, M.E.
The Composition of the Desoxyribonucleic Acid of Salmon Sperm
The Journal of Biological Chemistry 192, 223 - 230 (1951)
17. Chargaff, E., Lipshitz, R., and Green, C.
Composition of the Desoxypentose Nucleic Acids of Four Genera of
Sea Urchins
The Journal of Biological Chemistry 195, 155 - 160 (1952)

18. Dische, Z. Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der
Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben
in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen
Mikrochemie 8 , 4 - 32 (1930)

19. Feulgen, R. Über eine zusammengesetzte Nukleinsäure
Zeitschrift für Physiologische Chemie 108 , 147 - 157 (1919)

20. Feulgen, R. und Rossenbeck, H. Mikroskopisch-chemischer Nach-
weis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die
darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen
Präparaten
Zeitschrift für Physiologische Chemie 135 , 203 - 248 (1924)

21. Gauchel, F.D., Beyermann, K., and Zahn, R.K.
Micro-Determination of DNA in Biological Materials by Gas-Chroma-
tographic and Isotope Dilution Analysis of Thymine Content
FEBS Letters 6 , 141 - 144 (1970)

22. Gauchel, F.D., Gauchel, G., Beyermann, K. und Zahn, R.K.
Quantitative Bestimmung von DNA in Geweben durch Thymin Analyse.
I. Gaschromatographische Bestimmung
Zeitschrift für Analytische Chemie 259 , 177 - 183 (1972)

23. Gauchel, G., Gauchel, F.D., Beyermann, K. und Zahn, R.K.
Quantitative Bestimmung von DNA in Geweben durch Thymin Analyse.
II. Bestimmung durch Flüssigkeits-Chromatographie mit hohen Eingangs-
drücken an Ionenaustauschern
Zeitschrift für Analytische Chemie 259 , 183 - 187 (1972)

24. Gehrke, C.W., and Ruyle, C.D.
Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Nucleic Acid Components
Journal of Chromatography 38 , 473 - 491 (1968)

25. Giddings, J.C. "Dynamics of Chromatography" , Volume 1 ,
p. 24 - 30 , Marcel Dekker Inc. , New York (1965)

26. Grisewold, B.L. , Humoller, F.L. , and McIntyre, A.R.
Inorganic Phosphates and Phosphate Esters in Tissue Extracts
Analytical Chemistry 23 , 192 - 194 (1951)

27. Gulland, J.M. The Structures of Nucleic Acids
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 12 , 95-103 (1947)

28. Halasz, I. and Walkling, P.
Different Types of Packed Columns in Liquid Solid Chromatography
Journal of Chromatographic Science 7 , 129 - 136 (1969)

29. Hammarsten, E.
Eine "gekoppelte" Nucleinsäure aus Pankreas. I. Mitteilung
Zeitschrift für Physiologische Chemie 109 , 141 - 165 (1920)

30. Hashizume, T. and Sasaki, Y.
Base and Phosphorus Composition Analysis by Gas Chromatography
Analytical Biochemistry 24 , 232 - 242 (1968)

31. Holiday, E.R.
The Characteristic Absorption of UV - Radiation of Certain Purines
The Biochemical Journal 24 , 619 - 625 (1930)

32. Horvath, C.G. and Lipsky, S.R.
Use of Liquid Ion-Exchange Chromatography for the Separation of
Organic Compounds
Nature 211 , 748 - 749 (1966)

33. Horvath, C.G. , Preiss, B.A. , and Lipsky, S.R.
Fast Liquid Chromatography : An Investigation of Operating Parameters
and the Separation of Nucleotides on Pellicular Ion Exchangers
Analytical Chemistry 39 , 1422 - 1428 (1967)

34. Jervell, K., Diniz, C.R., and Mueller, G.C.
Early Effects of Estradiol on Nucleic Acid Metabolism in the Rat Uterus
The Journal of Biological Chemistry 231 , 945 - 959 (1958)
35. Jervell, K., Diniz, C.R., and Mueller, G.C.
The Determination of Uridine and Thymine in Small Samples of Nucleic Acid - Protein Residues
Archives of Biochemistry and Biophysics 78 , 157 - 164 (1958)
36. Jorpes, E. Zur Frage nach den Pankreasnukleinstäuren
Biochemische Zeitschrift 151 , 227 - 245 (1924)
37. Karger, B.L. "The Relationship of Theory to Practice in High-Speed Liquid Chromatography" , in : Kirkland, J.J. (Ed.) "Modern Practice of Liquid Chromatography" , p. 3 - 53 , Wiley Interscience-Publishers , New York + London (1971)
38. Kiesel, A. und Belozersky, A.
Untersuchungen über Protoplasma. V. Über die Nukleinstäure und die Nukleoproteide der Erbsenkeime
Zeitschrift für Physiologische Chemie 229 , 160 - 166 (1934)
39. Kirkland, J.J. A High-Performance Ultraviolet Photometric Detector for Use with Efficient Liquid Chromatographic Columns
Analytical Chemistry 40 , 391 - 396 (1968)
40. Kirkland, J.J. "The Practice of Liquid-Liquid Chromatography" , in : Kirkland, J.J. (Ed.) "Modern Practice of Liquid Chromatography" , p. 161 - 204 , Wiley-Interscience-Publishers , New York + London (1971)
41. Kossel, A. Ueber das Nuclein der Hefe
Zeitschrift für Physiologische Chemie 3 , 284 - 291 (1879)

43. Kossel, A. und Steudel, H.
Ueber einen basischen Bestandtheil thierischer Zellen
Zeitschrift für Physiologische Chemie 37, 177 - 180 (1902)
44. Lakings, D.B. and Gehrke, C.W.
Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Purine and Pyrimidine
Bases in Hydrolysates of Nucleic Acid
Clinical Chemistry 18, 810 - 813 (1972)
45. Levene, P.A. und Jacobs, W.A.
Über Inosinsäure
Berichte der Gesellschaft Deutscher Chemiker 42, 335 - 338 (1909)
46. Levene, P.A. und Jacobs, W.A.
Über die Pentose in den Nukleinsäuren 42, 2102 - 2106 (1909)
Berichte der Gesellschaft Deutscher Chemiker
47. Levene, P.A., Mikeska, L.A., and Mori, T.
On the Carbohydrate of Thymonucleic Acid
The Journal of Biological Chemistry 85, 785 - 787 (1929)
48. Loring, H.S., Fairley, J.L., Bortner, H.W., and Seagran, H.L.
A Spectrophotometric Method for the Analysis of the Purine and Pyri-
midine Components of Ribonucleic Acid
The Journal of Biological Chemistry 197, 809 - 821 (1952)
49. Marshak, A. and Marshak, C. Deoxyribonucleic Acid in Arbacia Eggs
Experimental Cell Research 5, 288 - 300 (1953)
50. McDonald, I.W. The Estimation of Purines in Nucleic Acids:
A Method Applicable to Materials with Low Concentration of Nucleic Acid
The Biochemical Journal 57, 566 - 568 (1954)

51. Meßbaum, W. Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen,
insbesondere in Derivaten der Adenylsäure
Zeitschrift für Physiologische Chemie 258 , 117 - 120 (1939)
52. Miescher, F. Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen
Hoppe - Seyler's Medizinisch-chemische Untersuchungen, S. 441 - 450
(1871)
53. Miescher, F. Die Kerngebilde im Dotter des Hühnereies
Hoppe - Seyler's Medizinisch-chemische Untersuchungen, S. 502 - 509
(1871)
54. Miescher, F. Die Spermatozoen einiger Wirbelthiere.
Ein Beitrag zur Histochemie
Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel
6 , 138 - 208 (1874)
erschienen bei Schweighausersche Verlagsbuchhandlung (1878)
55. Morrison, W.R. A Fast, Simple and Reliable Method for the
Microdetermination of Phosphorus in Biological Materials
Analytical Biochemistry 7 , 218 - 224 (1964)
56. Müller, W.E.G., Forster, W., Zahn, G. und Zahn, R.K.
Morphologische und biochemische Charakterisierung der Entwicklung
befruchteter Eier des Seeigels *Sphaerechinus granularis* Lam.
I. Aufzucht, Morphologie und elektronische Stadienbestimmung
Wilhelm Roux' Archiv 167 , 99 - 117 (1971)
57. Müller, W.E.G., Breter, H.J., Zahn, G. und Zahn, R.K.
Morphologische und biochemische Charakterisierung der Entwicklung
befruchteter Eier des Seeigels *Sphaerechinus granularis* Lam.
II. DNA, DNA-Polymerase und DNase
Wilhelm Roux' Archiv 174 , 117 - 132 (1974)

58. Ogur, M. and Rosen, G.
The Nucleic Acids of Plant Tissues. I. The Extraction and Estimation
of Desoxypentose Nucleic Acid and Pentose Nucleic Acid
Archives of Biochemistry 25, 262 - 276 (1950)
59. Osborne, T.B. und Harris, I.F.
Die Nucleinsture des Weizenembryos
Zeitschrift für Physiologische Chemie 36, 85 - 133 (1902)
60. Pauling, L. and Corey, R.B. A Proposed Structure for the
Nucleic Acids Proceedingsof the National Academy of
Sciences USA 39, 84 - 97 (1953)
61. Piccard, J.
Ueber Protamin, Guanin und Sarkin, als Bestandtheile des Lachssperma
Berichte der Gesellschaft Deutscher Chemiker 7, 1714 - 1719 (1874)
62. P·L - Biochemicals Inc., Biochemicals Reference Guide and Price List,
1037 West McKinley Ave., Milwaukee, Wi (USA)
63. Sasaki, Y. and Hashizume, T.
Gas Chromatography of Trimethylsilylated Bases and Nucleosides
Analytical Biochemistry 16, 1 - 19 (1966)
64. Schmidt, G. and Thannhauser, S.J.
A Method for the Determination of Desoxyribonucleic Acid, Ribonucleic
Acid and Phosphoproteins in Animal Tissues
The Journal of Biological Chemistry 161, 83 - 89 (1945)
65. Schneider, W.C.
Phosphorus Compounds in Animal Tissues. I. Extraction and Estimation
of Desoxypentose Nucleic Acid and of Pentose Nucleic Acid
The Journal of Biological Chemistry 161, 293 - 303 (1945)

66. Schwarz Bioresearch Inc., Biochemicals Reference Guide ,
Orangeburg, N.Y. (USA) (1973)

67. Scott, C.D. Analysis of Urine for Its Ultraviolet-Absorbing
Constituents by High-Pressure Anion-Exchange Chromatography
Clinical Chemistry 14 , 520 - 533 (1968)

68. Scott, C.D., Johnson, W.F., and Walker, V.E.
A Sample Injection Valve for Use in High-Pressure Liquid Chromatography
Analytical Biochemistry 32 , 182 - 184 (1969)

69. Scott, C.D. and Lee, N.E.
Dynamic Packing of Ion-Exchange Chromatographic Columns
Journal of Chromatography 42 , 263 - 265 (1969)

70. Scott, C.D.
The Liquid Chromatography of Some Benzodiazepines
The Journal of Chromatographic Science 8 , 446 - 448 (1970)

71. Sugar, D. and Fox, J.J.
Spectrophotometric Studies of Nucleic Acid Derivatives and Related
Compounds as a Function of pH. I. Pyrimidines
Biochimica et Biophysica Acta 9 , 199 - 218 (1952)

72. Snyder, L.R. "The Practice of Liquid-Solid Chromatography" ,
in: Kirkland, J.J. (Ed.) "Modern Practice of Liquid Chromatography" ,
p. 205 - 236 , Wiley Interscience-Publishers, New York + London (1971)

73. Solomon, B.
Nucleic Acid Content of the Egg of the Domestic Fowl
Biochimica et Biophysica Acta 23 , 211 - 213 (1957)

74. Solomon, J.B.
Nucleic Acid Content of Early Chick Embryos and the Hen's Egg
Biochimica et Biophysica Acta 24, 584 - 591 (1957)
75. Tamm, C., Hodes, M.E., and Chargaff, E.
The Formation of Apurinic Acid from the Deoxyribonucleic Acid
of Calf Thymus
The Journal of Biological Chemistry 195, 49 - 63 (1952)
76. Tswett, M.
Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung
auf die Chemie des Chlorophylls
Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 24, 384 - 393 (1906)
77. Vischer, E. and Chargaff, E. The Separation and Quantitative
Estimation of Purines and Pyrimidines in Minute Amounts
The Journal of Biological Chemistry 176, 703 - 714 (1948)
78. Volkin, E. and Cohn, W.E. "Estimation of Nucleic Acids", in :
Glick, D. (Ed.) "Methods of Biochemical Analysis", Volume 1,
p. 287, Interscience Publishers, New York, N.Y. (1954)
79. Walker, J.Q., Jackson, M.T., and Maynard, J.B.
"Chromatographic Systems. Maintenance and Troubleshooting", p.33,
Academic Press, New York + London (1972)
80. Walton, H.F. Ion - Exchange
Analytical Chemistry 46, 398 R - 413 R (1974)
81. Watson, J.D. and Crick, F.H.C.
Molecular Structure of Nucleic Acids. A Structure for Deoxyribose
Nucleic Acid.
Nature 171, 737 - 738 (1953)
82. Zweig, G. and Sherma, J. Chromatography
Analytical Chemistry 46, 73 R - 94 R (1974)

Lebenslauf

Geboren am 21.8.1945 in Wiesbaden als zweites Kind des Diplomingenieurs Dr. ing. Karl Günter Schnaus und seiner Ehefrau Ilse, geb. Schmidt.

Ab Frühjahr 1952 Besuch der Hebbelschule in Wiesbaden, anschließend bis 1965 des Helene-Lange-Realgymnasiums.

Am 16.2.1965 Reifeprüfung am neusprachlichen Zweig des Gynasiums.

Studium der Medizin in Mainz und Wien. Naturwissenschaftliche ärztliche Vorprüfung am 28.3.1966, ärztliche Vorprüfung am 23.3.1968, ärztliche Prüfung am 30.6.1971 jeweils an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz.

Von 1972 bis 1973 Medizinalassistentenzeit in Chirurgie, Innerer Medizin und Pädiatrie am Kreiskrankenhaus in Seligenstadt, am Konitzky-Stift in Bad Nauheim und an der Kinderklinik der Städtischen Kliniken in Wiesbaden.

Approbation als Arzt am 15.3.1973.

Seit dem 1.11.1973 Assistenzärztin an der Kinderabteilung des Stadtkrankenhauses in Rüsselsheim.

Am 22.8.1974 Heirat mit Dr. med. Hans-Joachim Breter.

